

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Analyse d'une méthode originale de repliement de protéines associant le sodium dodécyle sulfate et le 2-méthyle-2,4-pentanediol

Roussel, Guillaume

Award date:
2014

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITÉ DE NAMUR

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE

Analyse d'une méthode originale de repliement de protéines associant le sodium dodécyle sulfate et le 2-méthyle-2,4-pentanediol

Thèse présentée par
Guillaume Roussel,
pour l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du Jury :

Yves CAUDANO ; Université de Namur (Président du Jury)

Eric PERPÈTE ; Université de Namur (Secrétaire)

Catherine MICHAUX ; Université de Namur (Promoteur)

Xavier DE BOLLE ; Université Namur

André MATAGNE ; Université de Liège

Mark SANSOM ; Université d'Oxford

Mai 2014

©Presses universitaires de Namur & Guillaume Roussel
Rempart de la Vierge, 13
B-5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique

ISBN : 978-2-87037-846-5
Dépôt légal : D / 2014 / 1881 / 36

Université de Namur
Faculté des Sciences
rue de Bruxelles, 61, B-5000 Namur (Belgique)

Analyse d'une méthode originale de repliement de protéines par Guillaume Roussel

Résumé : La compréhension du phénomène de repliement constitue un défi majeur en biochimie structurale et en biophysique des protéines : la connaissance des mécanismes par lesquels les protéines adoptent une structure 3D particulière peut aider à comprendre et/ou prédire les fonctions des protéines. Il n'existe actuellement aucune méthode générale permettant de replier et caractériser une protéine. En effet, bien que de nombreux protocoles soient référencés dans la littérature, l'étude d'une nouvelle protéine fait, presque toujours, intervenir de nombreuses étapes préliminaires afin d'identifier les conditions permettant son repliement. Dans ce contexte, une méthode originale a récemment été mise en évidence, associant un détergent, le sodium dodécyle sulfate (SDS ; connu pour ses propriétés dénaturantes), à un cosolvant, le 2-méthyle-2,4-pentanediol (MPD). Bien que cette combinaison ait préalablement été appliquée avec succès afin d'induire la renaturation de différentes protéines (lysozyme, anhydrase carbonique et PagP), les mécanismes associés sont encore peu connus. L'objectif général de cette thèse est donc d'améliorer les connaissances générales afin de pouvoir optimiser la méthode. Pour cela, une stratégie en quatre temps a été suivie : (i) L'utilisation de l'Omp2a comme modèle de protéine membranaire multimérique a permis d'identifier le rapport de concentrations entre le détergent et le cosolvant menant à un repliement optimal de la protéine. (ii) En combinant des études expérimentales (mesures biophysiques) et théoriques (dynamique moléculaire), il a été possible de caractériser le processus de dénaturation de peptides modèles dans le SDS. (iii) La dissociation de micelles de SDS par le MPD a ensuite été mise en évidence par des mesures en diffusion lumineuse dynamique et des simulations en dynamiques moléculaires. (iv) Finalement, le repliement des peptides solubles en présence du couple SDS/MPD a permis de mettre en évidence le rôle clé du MPD pour protéger les peptides de l'effet dénaturant du SDS et permettre ainsi leur repliement.

Design of an original protein refolding strategy by Guillaume Roussel

Abstract : Currently, the investigation of protein refolding processes involves several time-consuming steps that require large amount of protein. In that context, it has been reported that 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) is able to modulate the denaturing properties of sodium dodecyl sulfate (SDS) and to induce the refolding of proteins. Nonetheless and even though this cosolvent effect was previously observed on the refolding of several proteins (including the lysozyme, the carbonic anhydrase, and PagP), little is known about the mechanism by which the MPD can turn the unfolding properties of SDS. The general objective of this thesis was therefore to go deeper in the understanding of the related mechanisms. In that context, a 4-steps strategy was developed : (i) the protocol was extended to the trimeric membrane protein Omp2a in order to demonstrate the transferability of the method to a multimeric protein and determine the optimal detergent/cosolvent ratio. (ii) The combination of experimental (biophysic spectroscopies) and theoretical (molecular dynamics) outputs gives us the opportunity to describe the SDS-induced unfolding states of model peptides. (iii) Then, the key role of MPD to induce the SDS micelle dissociation was unveiled by dynamic light scattering and molecular dynamics simulations. (iv) Finally, the refolding of model peptides was investigated in the presence of the detergent and the cosolvent.

Thèse de doctorat en Sciences chimiques (Ph.D. thesis in Chemistry)

Date : 27/06/2014

Département de Chimie

Promoteur (Advisor) : Catherine MICHAUX

Mes remerciements vont à :

Fabrice Bouillenne (Université de Liège) Pour son aide et son expertise dans le domaine de la chromatographie d'exclusion impliquant les peptides solubles.

Yves Caudano (Université de Namur) Pour sa disponibilité et son apport concernant les mesures en spectroscopie infrarouge.

Toni Collis (Université d'Edimbourg) Pour le support technique lors de l'utilisation du cluster Hercules (HPC-Europa2).

Xavier De Bolle (Université de Namur) Pour son implication dans le projet.

Thibaud Etienne (Université de Namur et Université de Lorraine)

Georges Feller (Université de Liège) Pour son expertise concernant les mesures en DLD en présence de peptides.

Jonathan Goole (Université Libre de Bruxelles) Pour son apport concernant les mesures en DLD impliquant des micelles.

André Matagne (Université de Liège) Pour sa disponibilité et son expertise concernant la structure et la stabilité des protéines.

Catherine Michaux (Université de Namur) Pour sa confiance, son soutien et sa disponibilité depuis maintenant 5 ans.

Eric Perpète (Université de Namur) Pour sa présence, son soutien et son expertise.

Sarah Rouse (Université d'Oxford) Pour le temps consacré à l'introduction aux méthodes théoriques utilisées dans ce travail.

Mark Sansom (Université d'Oxford) Pour m'avoir donné l'occasion d'intégrer brièvement son équipe de recherche et son soutien.

Emmanuel Tinti (Université de Namur)

Valérie Wathelet (Université de Namur)

Frédéric Wauthélet (Université de Namur) Pour sa disponibilité et ses conseils concernant l'utilisation des ressources computationnelles de l'Université de Namur.

Johan Wouters (Université de Namur) Pour son accueil lors de mon mémoire.

Ma famille Mon père et ma mère pour m'avoir donné l'occasion de réaliser mes études et m'avoir régulièrement soutenu. Pauline, Xavier et Gauthier pour avoir manifesté de l'intérêt à mon travail. Luc et Térésina pour être toujours disponibles et attentifs à mes avancées.

Mes amis Je n'oserai pas faire une liste, au risque d'oublier un prénom ... mais merci de votre présence !

AU	atomistique unifié
CAC	concentration d'agrégation critique
CMC	concentration micellaire critique
DC	dichroïsme circulaire
DDM	n-dodécyle- β -D-maltopyranoside
DEAE	diéthyle aminoéthyle
DLD	diffusion lumineuse dynamique
DM	dynamique moléculaire
FI	fluorescence intrinsèque
GG	gros grain
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IR	infrarouge
Omp	“outer membrane protein”
PDB	“protein data bank”
pI	point isoélectrique
R_g	rayon de giration
SAS	surface accessible au solvant
SDS	sodium dodécyle sulfate
SDS-PAGE	sodium dodécyle sulfate polyacrilamide gel
SPC	“single-point-charge”

Table des matières

1	Contexte de la recherche	1
1.1	Introduction aux protéines	1
1.1.1	Structure de protéines	1
1.1.2	Etude de la structure des protéines	4
1.2	Surexpression des protéines	6
1.3	Techniques de repliement des protéines	6
1.4	Le tampon de renaturation	7
1.4.1	Les additifs organiques	7
1.4.2	Les chaperones	8
1.4.3	Les détergents	8
1.5	Cas particulier de la combinaison du SDS et d'un cosolvant . .	10
1.6	Objectif et stratégie.	11
2	Application du binaire SDS/MPD sur le repliement d'une protéine membranaire	13
2.1	Introduction	13
2.1.1	Le système SDS-MPD	13
2.1.2	L'Omp2a en tant que modèle de protéine membranaire trimérique en tonneaux β	14
2.1.3	Objectifs et stratégie	14
2.2	Matériel et Méthodes	15
2.2.1	Surexpression protéique sous forme de corps d'inclusion	15
2.2.2	Purification	15
2.2.3	Repliement	16
2.2.4	Dichroïsme circulaire	16
2.3	Résultats	17
2.3.1	Surexpression protéique et purification	17
2.3.2	Optimisation du ratio détergent/cosolvant	18
2.3.3	Influence des paramètres physico-chimiques sur le repliement de l'Omp2a	21

2.3.4	Investigation autour du carbone asymétrique du MPD	23
2.3.5	Effet de différents alcools sur le repliement en présence de SDS	24
2.4	Conclusions	25
3	Déplieement de peptides modèles en présence de Sodium Dodécyle Sulfate	27
3.1	Introduction	27
3.1.1	Dénaturation par le sodium dodécyle sulfate	27
3.1.2	Présentation des peptides solubles modèles	29
3.2	Objectifs et stratégie	31
3.3	Matériel et Méthodes	31
3.3.1	Diffusion lumineuse dynamique (DLD)	31
3.3.2	Fluorescence intrinsèque (FI)	32
3.3.3	Dichroïsme circulaire (DC)	32
3.3.4	Spectroscopie infrarouge (IR)	33
3.3.5	Dynamique moléculaire	33
3.4	Résultats	37
3.4.1	Trois régions de dénaturation	37
3.4.2	Dénaturation du peptide TrpCage	38
3.4.3	Dénaturation du peptide TrpZip	44
3.4.4	Interactions SDS-peptide	49
3.5	Conclusions	54
4	Le binaire SDS/MPD	57
4.1	Introduction	57
4.1.1	Objectifs et stratégie	58
4.2	Matériel et Méthodes	59
4.2.1	Diffusion lumineuse dynamique	59
4.2.2	Dynamique moléculaire	59
4.3	Résultats	61
4.3.1	Effet du MPD sur une micelle de SDS	61
4.3.2	Importance du rapport SDS/MPD	64
4.3.3	Interactions spécifiques entre le détergent et le cosolvant	66
4.4	Conclusions	67
5	Le système SDS/MPD appliqué à des peptides modèles	71
5.1	Introduction	71
5.2	Objectifs et stratégie	71
5.3	Matériel et Méthodes	72
5.3.1	Fluorescence intrinsèque	72
5.3.2	Dichroïsme circulaire.	72
5.3.3	Dynamique moléculaire	72
5.3.4	Chromatographie d'exclusion	73
5.4	Résultats	73
5.4.1	Résistance à la dénaturation par le SDS	73
5.4.2	Renaturation de peptides dépliés par le SDS	78
5.4.3	Nature du cosolvant	82

5.5 Conclusions	85
6 Conclusions générales et perspectives	87
Bibliographie	93
7 Annexes - Publications	109

CHAPITRE 1

Contexte de la recherche

1.1 Introduction aux protéines

1.1.1 Structure de protéines

Les protéines sont des polymères d'acides aminés. Bien qu'il en existe plus d'une centaine, seuls 20 sont utilisés pour former les protéines et ils diffèrent par leurs chaînes latérales permettant de les classer en 4 catégories (Figure 1.1) : chargés (positivement ou négativement), polaires, apolaires (aliphatiques ou aromatiques) et neutres.

Ainsi, toutes les protéines sont synthétisées à partir de ces 20 résidus reliés entre eux de manière covalente par des liens peptidiques. Elles se différencient les unes des autres par le nombre et l'ordre des acides aminés, menant à une structure tridimensionnelle particulière. En effet, bien que synthétisée sous une forme linéaire, la chaîne polypeptidique est repliée au sein des cellules pour atteindre une conformation tridimensionnelle particulière à 4 niveaux :

Structure primaire. La séquence en acides aminés d'une protéine constitue sa structure primaire et renseigne donc la composition de la protéine et l'ordre dans lequel sont enchaînés les résidus. Par convention, le premier acide aminé est celui dont la fonction amine n'est pas impliquée dans une liaison peptidique (extrémité N-Terminale) tandis que le dernier acide aminé est celui dont la fonction carboxyle reste libre (C-terminale).

Structure secondaire. Sous ce terme sont rassemblées les différentes structures formées localement par la chaîne polypeptidique (Figure 1.2) :

1. L'hélice α (**A**). Au sein de cette structure, les acides aminés s'organisent en une hélice droite (3.6 résidus par tour) stabilisée par des ponts hy-

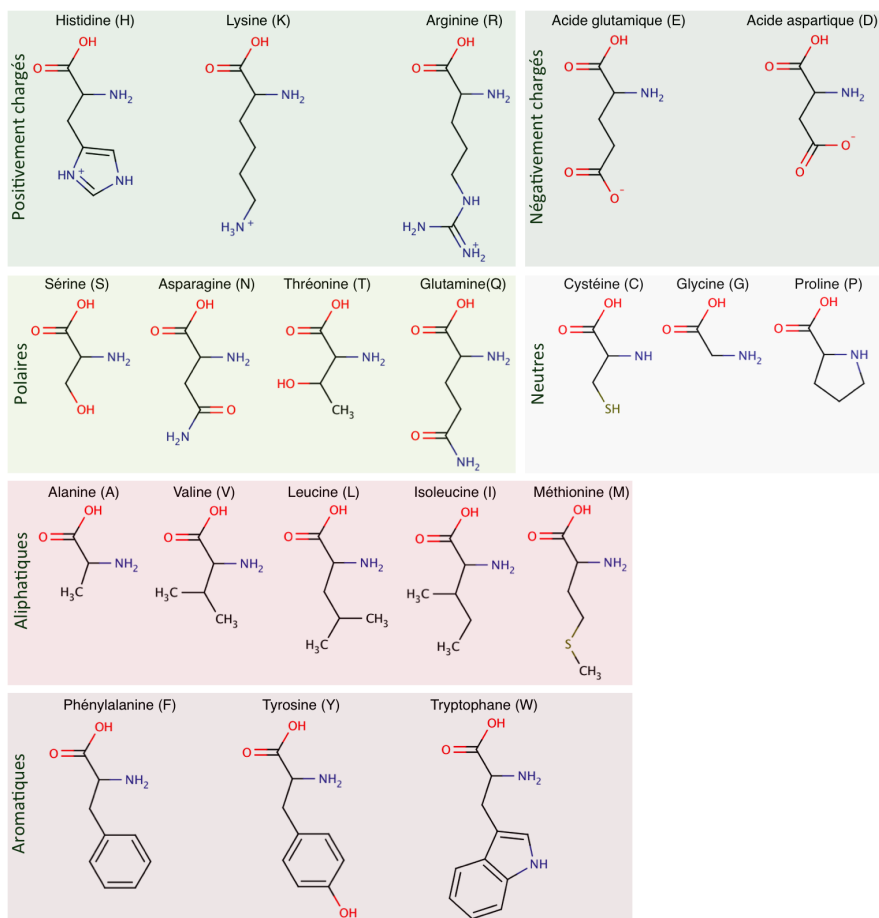


Figure 1.1 – Les 20 acides aminés présents au sein des protéines, répartis selon 4 classes : les résidus (i) chargés (vert foncé) positivement ou négativement à pH physiologique; (ii) polaires (vert clair); (iii) neutres (gris) et (iv) hydrophobes comprenant les résidus aliphatiques et aromatiques.

drogènes entre le groupement amine ($-N-H$) du résidu i et la fonction carboxyle du résidu $i+4$.

2. L'hélice 3_{10} (**B**). Cette structure diffère principalement de l'hélice α par l'organisation des liaisons hydrogènes qui ont lieu entre les résidus i et $i+3$.
3. Les feuillets β . Ceux-ci sont composés de brins β adjacents. Deux topologies sont possibles en fonction de l'orientation des brins : parallèle (**C**) ou anti-parallèle (**D**). Dans les deux cas, les chaînes polypeptidiques (composées des carbones α) forment un plan et les chaînes latérales pointent en alternance de chaque côté du celui-ci. Cette structure est stabilisée par

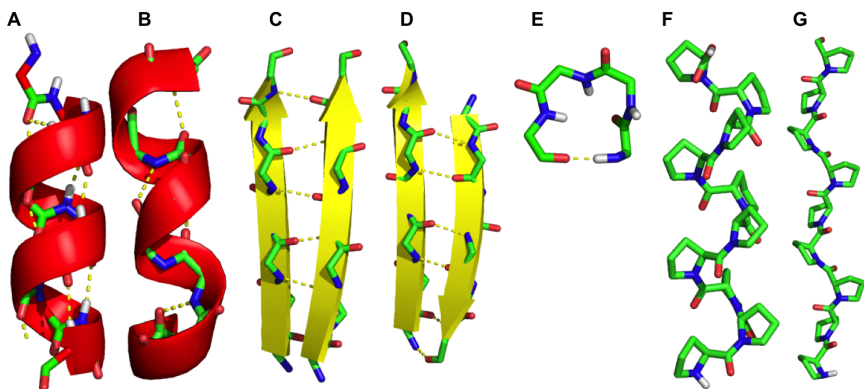


Figure 1.2 – Représentation des différentes structures secondaires : (A) Hélice α , (B) Hélice 3_{10} , Feuillet- β parallèle (C) ou antiparallèle (D), Coude- β (E) et Hélices Polyproline I (F) et II (G).

des liaisons hydrogènes (groupement amine et carboxyle) dans le plan du feuillet.

4. Les coudes. Ce motif est caractérisé par deux carbones α proches dans l'espace ($< 7 \text{ \AA}$) mais séparés par seulement 1 à 5 résidus [Venkatachalam, 1968]. Les coudes- β (à 4 résidus) sont les plus répandus et sont souvent stabilisés par un pont hydrogène entre le résidu 1 (i) et le résidu 4 ($i+3$) (E). Lorsqu'un coude de cette catégorie est situé entre deux brins β antiparallèles, il forme une structure particulière nommée épingle- β .
5. L'hélice polyproline. Comme le nom l'indique, cette structure résulte d'une suite de résidus prolines dans la séquence protéique. Deux topologies existent : l'hélice droite polyproline I (3.3 résidus par tour, F) et l'hélice gauche polyproline II (3 résidus par tour, G). Dans les deux cas cette structure est le résultat de l'organisation particulière des résidus proline et n'est pas stabilisée par des ponts-hydrogènes.

Structure tertiaire. Ce niveau d'organisation correspond au repliement de la chaîne polypeptidique sur elle même. En effet, les différentes structures secondaires s'agencent dans l'espace pour former une structure plus compacte présentant une structure tridimensionnelle très spécifique. Plusieurs types d'interactions interviennent dans le processus de repliement :

1. L'effet hydrophobe. Ce modèle a été proposé à partir des observations montrant que, dans la conformation native, les résidus apolaires sont généralement localisés à l'intérieur de la structure de la protéine ; tandis que les résidus polaires et chargés sont présentés à la surface de la protéine. En effet, à l'état dénaturé, tous les résidus sont exposés au solvant et sont donc hydratés par les molécules d'eau. Dans le cas des résidus apolaires, cet arrangement est énergétiquement défavorable et ceux-ci se regroupent à l'intérieur de la structure protéique, à l'abri des molécules

d'eau, permettant d'induire le repliement. L'effet hydrophobe peut donc être résumé comme la combinaison d'une diminution de l'hydratation défavorable des résidus apolaires et une augmentation des interactions favorables entre molécules d'eau [Makhatadze et Privalov, 1995] et serait la force majeure induisant le repliement des protéines [Dill, 1990] et de leur stabilité [Demarest *et al.*, 2001].

2. Liaisons hydrogènes intramoléculaires. Au cours du processus de repliement des protéines, les ponts hydrogènes formés entre les molécules de d'eau et la chaîne polypeptidique sont peu à peu remplacés par de nouveaux intramoléculaires. Cette réorganisation permet de stabiliser la structure native de la protéine [Pace *et al.*, 1996] et joue un rôle aussi important que l'effet hydrophobe [Pace *et al.*, 1996, Onuchic et Wolynes, 2004].
3. Interactions électrostatiques. Celles-ci permettent de stabiliser la structure native [Kumar et Nussinov, 2002]. De plus, la spécificité de ce type d'interaction joue un rôle clé dans l'organisation finale de la structure de la protéine [Negin et Carbeck, 2002].

Structure quaternaire. Cette structure résulte de l'assemblage de différentes chaînes d'acides aminés dans leurs conformations tridimensionnelles et n'est donc associée qu'aux protéines hétéromultimériques.

1.1.2 Etude de la structure des protéines

Pourquoi étudier la structure des protéines ? Les protéines sont les macromolécules les plus abondantes présentes au sein d'une cellule (consistant environ 60% du poids sec). En effet, celles-ci assurent la grande majorité des fonctions cellulaires telles que :

- La structure et le soutien. De nombreuses protéines (actine, collagène, élastine, ...) maintiennent la structure d'une cellule ; ou servent de support dans le milieu cellulaire formant ainsi un échaffaudage utilisé par d'autres protéines.
- L'adhésion cellulaire. La cohésion entre les cellules est assurée par des protéines spécifiques (GAP junction).
- Un signal cellulaire. Certaines protéines jouent le rôle de signal moléculaire (par exemple l'insuline) permettant ainsi d'induire une réponse cellulaire.
- La réception de signaux. Les récepteurs capables de capter le signal et de réagir sont eux-mêmes de nature protéique.
- La transduction de signaux. Les protéines G, par exemple, forment une classe d'effecteurs activés par un récepteur et assurant le transfert d'un signal au sein d'une cellule.
- L'immunité. Le système immunitaire est basé sur des cellules utilisant des protéines (classe des MHC, par exemple) afin de détecter des molécules exogènes.

- Le transport. Des protéines assurent le passage de molécules à travers les membranes cellulaires permettant de faire entrer sélectivement (ou pas) différents composés dans les différents compartiments cellulaires.
- L'activité catalytique. Toutes les réactions chimiques cellulaires sont réalisées à l'aide de protéines spécialisées et dédiées à une fonction en particulier.
- ...

Ainsi, bien que toutes les protéines soient composées des mêmes 20 acides aminés ; elles peuvent exercer des fonctions très différentes. On estime ainsi le nombre de protéines différentes à 60 000. Celles-ci se différencient par leurs structures natives respectives ; découlant de la structure primaire et donc de l'ordre et du nombre de résidus composant chaque protéine. Il existe en effet un lien très étroit entre la structure d'une protéine et sa fonction. En effet, parfois, une simple variation d'un acide aminé dans la séquence primaire (changement d'un résidu pour un autre, absence ou présence d'un acide aminé supplémentaire, ...) peut mener à un dysfonctionnement de la protéine. Un exemple particulièrement étudié est le cas de la mucosviscidose. Cette maladie est le résultat d'une courte délétion au sein de la séquence primaire (3 résidus ; [Mall et Hartl, 2014]) de la protéine CFTR dont le rôle est le transport des ions Cl^- . Cette mutation entraîne un léger changement de conformation empêchant le passage des ions vers la lumière du système respiratoire, réduisant ainsi l'hydratation du mucus. Celui-ci devient plus visqueux et est donc moins facilement évacué, augmentant les risques d'infection des voies respiratoires. Un simple changement de la structure de la protéine CFTR a donc un effet physiologique majeur.

Afin de comprendre le rôle d'une protéine, il est donc nécessaire d'avoir accès à sa structure tridimensionnelle.

Comment atteindre la structure tridimensionnelle d'une protéine ?.

Il existe deux grandes méthodes permettant d'obtenir la structure d'une protéine à une résolution atomique : (i) La résonance magnétique nucléaire (RMN) qui permet d'identifier des atomes proches dans l'espace qui ne sont pas liés de manière covalente. A partir de ces informations, il est possible de déterminer la structure d'une protéine en solution. Néanmoins, cette technique est souvent limitée à des protéines relativement petites (jusqu'à 30 kDa). (ii) La radiocristallographie. Cette technique fait intervenir des cristaux de protéines soumis à un rayonnement X et induisant un phénomène de diffraction. La mesure des angles et de l'intensité des rayons diffractés permet de déterminer la densité électronique au sein du cristal. A partir de ces informations, il est possible de déterminer la position des atomes (on connaît la séquence primaire de la protéine et donc l'ordre des acides aminés et des atomes les constituant) et d'ainsi obtenir la structure tridimensionnelle de la protéine.

Quelle que soit la méthode utilisée, une grande quantité de la protéine dans sa conformation native est requise. Il est donc nécessaire de pouvoir surexprimer la protéine d'intérêt.//

1.2 Surexpression des protéines

Il existe deux alternatives permettant d'obtenir une protéine en grande quantité :

La surexpression native. Il est possible d'induire la surproduction d'une protéine sous sa forme native au sein d'un organisme hôte (bactéries [Bednarska *et al.*, 2013], levure [Cregg *et al.*, 2009], ...) et ensuite d'isoler la protéine en combinant des techniques de centrifugations différentielles et des étapes de purifications. Néanmoins, les quantités récupérées sont généralement faibles [Jonasson *et al.*, 2002]. De plus, les protéines membranaires surexprimées de cette manière ont tendance à s'insérer au niveau de la membrane plasmique saturant les systèmes d'insertion en membrane de l'hôte, ce qui résulte en un effet cytoxique réduisant encore les rendements de production [Junge *et al.*, 2008, Laage et Langosch, 2001].

Surexpression sous forme de corps d'inclusion. Une alternative consiste à induire l'expression des protéines sous la forme de corps d'inclusion (CI) en *Escherichia coli*. Ceux-ci sont des agrégats massifs de protéines pouvant représenter jusqu'à 50 % des protéines totales de la bactérie. En effet, l'utilisation de vecteurs d'expression particuliers permet d'induire la production d'une protéine en quantité importante. La machinerie cellulaire n'est alors pas capable de prendre en charge toutes les protéines produites qui s'aggrègent alors dans le cytoplasme sous la forme de CI [Bannwarth et Schulz, 2003]. Dans le cas de protéines membranaires, la surexpression sous cette forme peut être induite en retirant la séquence d'insertion en membrane (quelques résidus au niveau de l'extrémité N-terminale indiquant à la machinerie cellulaire d'adresser la protéine en membrane). Généralement, l'expression de protéines sous la forme de CI permet d'obtenir des quantités jusqu'à 1000 fois supérieures à l'expression native ([?]). Au sein des CI, les protéines peuvent être complètement dénaturées, partiellement dénaturées (présence de structures secondaires) ou natives et fonctionnelles [Gonzalez-Montalban *et al.*, 2008, Martinez-Alonso *et al.*, 2008]. En réalité, des études ont montrés que les CI pouvaient être constitués de différentes formes des protéines [Rinas *et al.*, 2007, Schrodell et de Marco, 2005]. Quelque soit l'état de la protéine d'intérêt, le défi majeur consiste à solubiliser les CI afin d'obtenir des protéines isolées. Les CI sont d'abord isolés du reste du contenu cellulaire par centrifugation sont ensuite solubilisés en présence de fortes concentrations d'agent solubilisants tels que l'urée (8 M), le chlorure du guanidium (6 M) ou encore certains détergents (par exemple le SDS) afin de récupérer les protéines d'intérêt [Vallejo et Rinas, 2004, Dempsey *et al.*, 2005]. Quelque soit le traitement appliqué, les protéines sont généralement solubilisées dans un état dénaturé et doivent donc être renaturées.

1.3 Techniques de repliement des protéines

Différentes méthodes permettent d'induire le processus de repliement et de récupérer une structure native de protéines solubilisées à partir de corps d'in-

clusion :

Dilution directe. Cette méthode est la plus simple et la plus utilisée et consiste à simplement diluer l'échantillon protéique dans un tampon de renaturation afin de réduire la concentration en agent dénaturant (l'urée ou le chlorure de guanidium) [Canaan *et al.*, 2004, Bannwarth et Schulz, 2003]. Le processus de renaturation peut ainsi être déclenché et la forme native de la protéine peut éventuellement être récupérée. Cette technique a pour principal inconvénient de diluer l'échantillon et la concentration finale en protéine est de l'ordre du microgramme (10 μ g). De plus, le changement de milieu brusque peut parfois s'accompagner de la précipitation irréversible de la protéine au sein de l'échantillon.

Dialyse. Le principe de cette technique est identique à la méthode de dilution et permet de réduire la concentration en agent dénaturant tout ajoutant le tampon de renaturation. Cette fois ci, l'utilisation d'une membrane de dialyse permet de contrôler le changement de tampon qui peut dès lors être graduel afin de réduire les risques de précipitations. Néanmoins, la concentration en protéine reste relativement faible et la membrane de dialyse n'est pas toujours compatible avec les tampons de renaturation.

Sur colonne. Deux méthodes : (i) La chromatographie d'exclusion permet d'échanger le tampon contenant l'agent dénaturant au profit d'un nouveau tampon permettant le repliement de la protéine. Ainsi, les échantillons sont injectés dans une colonne préalablement conditionnée dans le tampon de renaturation permettant un échange de tampon moins brusque. (ii) La chromatographie d'affinité a pour avantage d'attacher la protéine d'intérêt à une matrice (échangeuse d'ions ou d'affinité) et de changer le milieu dans lequel elle se trouve. Il est ainsi possible de contrôler finement le changement du tampon. De plus, les protéines étant liées à la matrice, les interactions "protéine-protéine" sont quasiment nulles minimisant les risques de précipitation. Néanmoins, les techniques associées à des colonnes restent cependant limitées à l'utilisation de petits volumes d'échantillon (de l'ordre de quelques millilitres). De plus, dans le cas de l'utilisation de la chromatographie d'affinité, l'ajout d'une "étiquette" est obligatoire et peut interférer avec le processus de repliement.

1.4 Le tampon de renaturation

1.4.1 Les additifs organiques

L'ajout de petites molécules organiques permet d'augmenter la solubilité et la stabilité des protéines [Basu *et al.*, 2011]. Par exemple, l'ajout d'arginine à forte concentration dans le milieu (0.4 à 1.0 M) permet de favoriser le repliement de protéines solubles [De Bernardes Clark *et al.*, 1999]. En effet, cet acide aminé est capable de couvrir les régions hydrophobes des protéines partiellement repliées et d'éviter ainsi le processus d'agrégation [Tsumoto *et al.*, 2004]. De manière surprenante, de faibles concentrations (1 à 2 M) en urée ou en chlorure de guanidium (connus pour leurs propriétés dénaturantes) favorisent le repliement de certaines protéines [Burgess, 2009, Dempsey *et al.*, 2005]. En

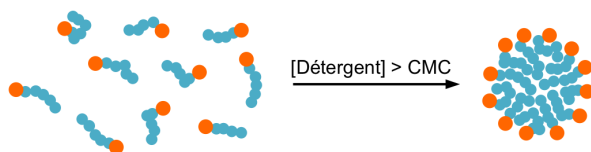


Figure 1.3 — Représentation schématique de l’assemblage spontané de monomères de détergent en micelles au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC).

effet à ces faibles concentrations, ces molécules solubiliseront la chaîne polypeptidique réduisant les risques de précipitation. D’autres molécules telles que le polyéthylène glycol, le glycérol ou encore des sucres sont également capables de favoriser le retour à un état natif, bien que le mécanisme ne soit pas encore élucidé [Clark, 1998, Vallejo et Rinas, 2004].

Il n’existe cependant pas d’additif “universel” applicable à une large gamme de protéines et la capacité à induire le repliement se limite souvent aux protéines solubles [Gautam *et al.*, 2012].

1.4.2 Les chaperones

Il existe au sein des cellules une classe de protéines dont le rôle est de faciliter le repliement des protéines : les chaperones [Hartl et Hayer-Hartl, 2002]. Il est possible d’utiliser celles-ci afin d’induire le repliement de protéine *in vitro*. Par exemple, il a été possible de récupérer la structure native de nombreuses protéines solubles exprimées sous forme de CI et solubilisée dans de l’urée à faible concentration en présence de la chaperone GroEL de *Escherichia coli* [JG *et al.*, 1997]. D’autres types de chaperones, telle que ClpB [Haslberger *et al.*, 2010], sont capables de directement séparer les protéines des corps d’inclusion et d’induire leur repliement [Guenther *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2003]. L’inconvénient majeur de cette technique est le coût associé aux étapes de production et purification de la chaperone. Une alternative consiste à augmenter artificiellement la concentration en chaperones au sein des bactéries afin de directement induire le repliement des protéines au sein du cytosol et minimiser la formation des corps d’inclusion. Pour cela, deux alternatives existent : (i) En soumettant les bactéries (hôtes de la surexpression) à un stress salin ou thermique, celles-ci ont tendance à augmenter la production de chaperones endogènes, qui peuvent être utilisées par la suite pour optimiser le repliement *in vivo* d’une protéine d’intérêt surexprimée [de Marco *et al.*, 2005]. (ii) Une alternative consiste à co-exprimer la protéine d’intérêt avec une ou plusieurs chaperones favorisant ainsi le processus de repliement *in vivo* [de Marco, 2007a, de Marco, 2007b].

1.4.3 Les détergents

Les détergents sont des molécules amphipatiques, c’est-à-dire qu’ils possèdent une tête polaire (hydrophile) et une queue apolaire (hydrophobe). Une de leurs caractéristique principale est la capacité à s’auto-assembler en structures sphériques,

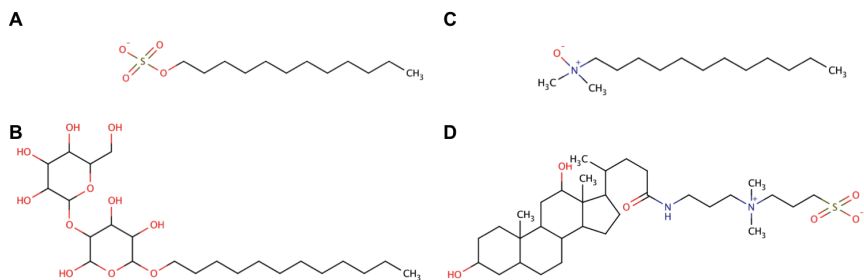


Figure 1.4 – Différentes classes de détergent : (A) Les détergents ioniques portant une charge nette positive ou négative ; représentés par le sodium dodécyle sulfate. (B) Les détergents non-ioniques neutres avec dodécyle-malto-β-D-pyranoside en exemple. (C) Les détergents zwitterioniques portant des charges nettes mais globalement neutres, tel que dans le cas du lauryle diméthyle amine oxide. (D) Les détergents dérivés de sels biliaires tel que le CHAPS.

appelées micelles, au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC, Figure 1.3). Celle-ci varie selon (i) la longueur de la chaîne hydrophobe (plus celle-ci est longue, plus la CMC est petite), (ii) la température (la solubilité des détergents a tendance à diminuer avec une baisse de la température) et (iii) la force ionique (la présence d’ions peut modifier le comportement du monomère et la forme des micelles).

Les détergents sont classés en 4 catégories en fonction de leur structure (Figure 1.4) :

Ioniques. La tête du détergent possède une charge globale (positive ou négative). L’exemple le plus courant est le sodium dodécyle sulfate (SDS) qui est un détergent anionique (charge négative). Ces détergents sont très efficaces pour solubiliser les protéines [Zuev *et al.*, 2004], mais induisent presque toujours la perte de la structure native [Mattice *et al.*, 1976, Otzen, 2002, Bhuyan, 2010].

Non-ioniques. La tête du détergent n’est pas chargée mais polaire (souvent une structure de type sucre). Ces détergents sont souvent capables de solubiliser les protéines et d’induire leur repliement et sont qualifiés de “détergents doux” (Par exemple, n-dodécyl-β-D-maltopyranoside).

Zwitterioniques. Puisque ces détergents portent des charges globales, mais sont globalement neutres. Ils combinent les propriétés des détergents ioniques avec celles des détergents non-ioniques.

Sels biliaires. La structure de la partie hydrophobe de cette classe de détergent est basée sur celle des stéroïdes. Ces détergents sont donc particulièrement rigides.

D’une manière générale, l’étude du repliement des protéines implique l’utilisation de détergents définis comme “doux” issus de la classe des détergents “non-ioniques”. Néanmoins, de nombreux détergents existent et il n’en n’existe

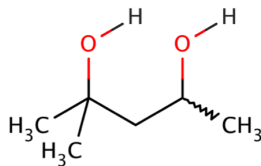


Figure 1.5 – Structure chimique du 2-méthyle-2,4-pentanediol (MPD).

pas un applicable à tous les types de protéines. Un étape de criblage est souvent nécessaire afin d'identifier celui (ou éventuellement ceux) qui permet de maintenir la protéine soluble après le retrait de l'agent solubilisant et de récupérer la structure native. Le travail reste encore aujourd'hui long et contraignant.

1.5 Cas particulier de la combinaison du SDS et d'un cosolvant

Récemment, un procédé novateur de renaturation de protéines associant un détergent et un cosolvant a été proposé [Michaux *et al.*, 2008a]. Il a ainsi été montré que des protéines (solubles ou membranaires) solubilisées et dénaturées en présence de SDS pouvaient récupérer leur structure et fonction respectives suite à l'ajout d'un cosolvant : le 2-méthyle-2,4-pentanediol (MPD ; Figure 1.5). Par exemple, le repliement du lysozyme et de l'anhydrase carbonique, deux protéines solubles, a pu être induit par le MPD malgré la présence du SDS. De plus, en présence du mélange cosolvant/détergent, ces protéines ont pu récupérer un niveau d'activité proche de l'état natif. L'utilisation de cette méthode originale a même permis d'induire le repliement d'une protéine membranaire (PagP).

Cette technique présente d'importantes potentialités dans l'étude du repliement de protéines :

1. Le SDS est capable de solubiliser les corps d'inclusion et de maintenir les protéines sous une forme soluble [Gao *et al.*, 2005, Nielsen *et al.*, 2005] et permettrait donc de remplacer les agents solubilisant classiques (urée et chlorure de guanidium) qui interfèrent souvent avec les mesures spectroscopiques.
2. Le système semble applicable à des protéines présentant des structures secondaires différentes (hélice α et feuillets- β).
3. Le rapport entre la concentration en détergent (millimolaire) et en cosolvant (molaire) est semblable que les protéines soient solubles ou membranaires, suggérant un mécanisme potentiellement universel. (A améliorer)
4. L'usage du SDS et du MPD est compatible avec la cristallisation de protéines permettant de résoudre la structure tridimensionnelle de protéines par diffraction de rayons X. En effet, les structures du lysozyme et

de PagP ont pu être déterminée en présence du mélange SDS/MPD [Michaux *et al.*, 2008b, Cuesta-Seijo *et al.*, 2010].

1.6 Objectif et stratégie.

Cette thèse s'intègre dans un projet de recherche dont l'achèvement final est de proposer de nouvelles méthodes de repliement de protéines. L'objectif de ce travail est d'améliorer la compréhension des mécanismes par lesquels le MPD peut induire le repliement de protéines préalablement dénaturées dans le SDS.

Afin d'y parvenir, une stratégie en plusieurs étapes, associées à des sous-objectifs, est établie :

1. **Appliquer la méthode originale sur une protéine membranaire multimérique.** L'Omp2a de *Brucella melitensis* (une protéine membranaire trimérique en tonneaux β) a été choisie afin de vérifier s'il est possible de récupérer, pour la première fois, la structure native d'une protéine complexe multimérique à partir de corps d'inclusion en présence du SDS et du MPD. Dans un premier temps, le rapport entre le détergent et le cosolvant le plus efficace pour induire le repliement de la protéine sera déterminé et le processus de renaturation sera optimisé en faisant varier différents paramètres physico-chimiques. Ces résultats seront comparés à ceux obtenus en présence d'un détergent classique préalablement identifié par criblage (n-dodécyle- β -D-maltopyranoside). Ensuite, la structure repliée de l'Omp2a dans les conditions déterminées comme optimales sera caractérisée.

Dans le but de pouvoir comprendre comment le MPD induit le repliement de protéines et de mettre en évidence les interactions spécifiques entre les différents partenaires impliqués, le système sera ensuite simplifié en utilisant deux peptides modèles de structures secondaires différentes : Le Trpcage constitué d'une hélice α et le Trpzip en feuillet β . Leur simplicité (nombre de résidus, structure déterminée et pas d'intermédiaires de repliement) et leur maniabilité (solubles, disponibles commercialement) en font des outils puissants pour l'étude des mécanismes de dépliement et repliement. De plus, il sera possible de combiner (i) des études expérimentales (fluorescence intrinsèque, dichroïsme circulaire, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) afin d'obtenir des informations sur la structure des ces deux peptides dans différentes conditions; (ii) à des résultats théoriques (dynamique moléculaire) permettant d'obtenir des informations sur le système à l'échelle atomique.

f

2. **Etudier la dénaturation des peptides dans le SDS.** Bien que largement utilisé pour ses propriétés dénaturantes, le mécanisme par lequel le SDS induit le dépliement de protéines reste peu connu. De plus,

malgré de nombreuses études de dénaturations impliquant nos deux peptides (hautes températures [Day *et al.*, 2010, Paschek *et al.*, 2008, Settanni et Fersht, 2008] ou en présence d'urée [Heyda *et al.*, 2011, Wafer *et al.*, 2010, Muñoz *et al.*, 2006]), il n'existe actuellement pas d'informations concernant leur dépliement par le SDS. Cette étape permettra donc de caractériser la structure des peptides solubles induite par le SDS et d'identifier les interactions spécifiques avec le détergent, responsables du processus de dénaturation.

3. **Focaliser sur le couple SDS/MPD.** Avant d'étudier le repliement des peptides, il est intéressant de mettre en évidence l'effet du cosolvant sur le SDS. Dans ce cadre, des mesures de diffusion lumineuse combinées à des simulations en gros grains permettront de comprendre comment le MPD peut affecter la stabilité de micelles de SDS. Un modèle atomistique sera finalement utilisé afin d'identifier les interactions entre le détergent et le cosolvant.
4. **Comprendre comment le MPD interfère avec le processus de dénaturation par le SDS.** Premièrement, la capacité du MPD à induire une résistance à la dénaturation sera étudiée en solubilisant les peptides dans un tampon contenant le MPD et en ajoutant ensuite le détergent. Deuxièmement, le processus de repliement sera induit en ajoutant le MPD à des échantillons préalablement dénaturés par le SDS, et un ratio idéal sera déterminé et comparé au cas membranaire. Ensuite, les interactions entre les peptides et le détergent et le cosolvant seront mises en évidence par chromatographie d'exclusion et des simulations atomistiques. Finalement, l'utilisation de différents couples SDS/cosolvants pour induire ou non le repliement des peptides permettra d'identifier les caractéristiques nécessaires permettant à un cosolvant d'inverser les propriétés dénaturantes du SDS.

Application du binaire SDS/MPD sur le repliement d'une protéine membranaire

2.1 Introduction

2.1.1 Le système SDS-MPD

Le sodium dodécyle sulfate (SDS) est un détergent capable de dénaturer des protéines solubles et membranaires. Contrairement à d'autres agents dénaturant tels que l'urée ou le chlorure de guanidium nécessitant de travailler à des concentrations molaires très élevées (de l'ordre de 6 à 8 M) [Candotti *et al.*, 2013, Dempsey *et al.*, 2005, Heyda *et al.*, 2011], le SDS induit le dépliement de protéines à des concentrations millimolaires [Andersen *et al.*, 2009, Tulumello et Deber, 2009, Bhuyan, 2010]. De précédentes études impliquant des protéines solubles (anhydrase carbonique et lysozyme) et membranaires (PagP et Bactériorhodopsine) ont montré que le 2-méthyl-2,4-pentendiol (MPD) pouvait avoir un effet protecteur contre la dénaturation par SDS et même permettre d'induire le repliement de protéines préalablement dénaturées par le SDS [Michaux *et al.*, 2008a, Michaux *et al.*, 2008b, Cuesta-Seijo *et al.*, 2010]. Plus précisément, il a été montré que l'anhydrase carbonique et le lysozyme perdent leur activité et structure respectives en présence de très faibles concentrations en SDS (1 mM), mais que l'ajout de concentrations molaires (de l'ordre de 1 à 2 M) de MPD permettait de récupérer une structure native et fonctionnelle [Michaux *et al.*, 2008a, Michaux *et al.*, 2008b]. Du côté de PagP, une protéine membranaire en tonneau β , bien qu'il faille travailler à une concentration supérieure en SDS (70 mM) afin de maintenir les régions hydrophobes solubles et d'éviter la précipitation des protéines, l'ajout de MPD en concentration molaire (1 M) favorise également le repliement de la protéine [Michaux *et al.*, 2008a]. Dans tous les cas, le SDS en concentration **millimolaire** associé

à une concentration **molaire** de MPD permet la renaturation de protéines.

2.1.2 L'Omp2a en tant que modèle de protéine membranaire trimérique en tonneaux β

L'Omp2a (pour *outer membrane protein*) est une porine de la membrane externe de la bactérie pathogène *Brucella melitensis* dont le rôle probable est d'assurer la diffusion passive d'ions, d'acides aminés et de petits sucres [Marquis et Ficht, 1993, Mobasheri *et al.*, 1997]. Comme la majorité des porines de la membrane externe, l'Omp2a présente une structure trimérique en tonneaux β , eux-mêmes constitués de 16 brins β anti-parallèles [Paquet *et al.*, 2000, Paquet *et al.*, 2001] (Voir Figure 2.1).

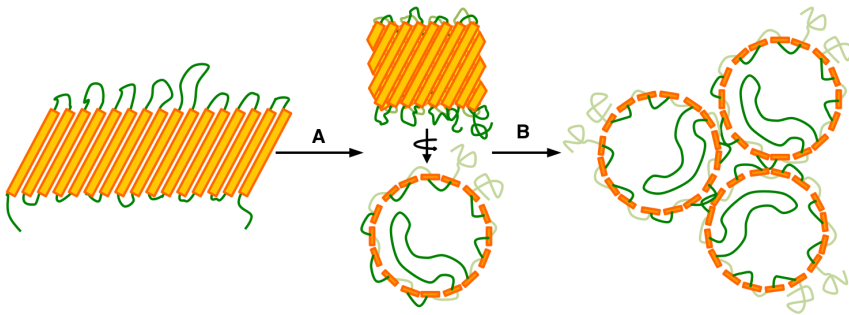


Figure 2.1 — Représentation schématique de l'Omp2a de *Brucella melitensis* à 16 brins β antiparallèles. (A) Renaturation sous la forme d'un tonneau β , (B) Oligomérisation sous la forme trimérique native.

Au cours de ce chapitre, nous utiliserons cette porine en tant que modèle de protéine membranaire puisqu'elle présente comme avantages (i) d'exister sous une forme trimérique nous permettant pour la première fois de déterminer si la méthode SDS/MPD est capable d'induire la renaturation d'une protéine multimérique; et (ii) d'avoir été précédemment repliée et caractérisée en présence d'un détergent couramment utilisé dans les études de renaturation de protéines membranaires (le n-dodécyle- β -D-maltopyranoside; DDM) [Roussel *et al.*, 2012] permettant ainsi de comparer la renaturation par une méthode "classique" avec notre méthode originale associant le SDS et le MPD.

2.1.3 Objectifs et stratégie

L'objectif général de ce chapitre est d'appliquer la méthode originale associant le SDS et le MPD sur une protéine membranaire multimérique afin d'induire sa renaturation.

De manière plus spécifique, le ratio SDS/MPD permettant d'induire de manière optimale le repliement de l'Omp2a sera premièrement déterminé et comparé aux résultats précédents afin de déterminer la transférabilité de la méthode. L'influence de différents paramètres physico-chimiques (concentration en protéine, température, pH et force ionique) sur les rendements de repliement

sera ensuite étudiée. Finalement, afin de déterminer la spécificité du MPD dans le mécanisme de renaturation, d'autres couples SDS/alcools seront testés.

2.2 Matériel et Méthodes

2.2.1 Surexpression protéique sous forme de corps d'inclusion

Des bactéries *Escherichia coli* BL21 (DE3)(pLysS) transformées par un vecteur (pET2a) optimisé pour la surexpression de protéines et contenant la séquence codante de l'Omp2a sont mises en culture (1 L) dans un milieu LB (10 g hydrolysate de caséine, 5 g NaCl et 5 g extrait de levure) enrichi de chloramphénicol (20 µg/mL) et d'ampicilline (100 µg/mL) à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique (mesurée par l'absorbance à 600 nm) comprise entre 0.6 et 0.8. L'expression protéique (3 heures à 37°C) est alors induite en ajoutant l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.2 mg/mL) dans le milieu. Les bactéries contenant les corps d'inclusion sont ensuite récupérées par centrifugation (30 minutes à 4000 rpm) et le culot bactérien est resuspendu dans un tampon de solubilisation (20 mL ; 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA). Afin de récupérer les corps d'inclusion produits à l'intérieur des bactéries, une étape de lyse bactérienne est réalisée par ajout de déoxycholate de sodium (40 mg/20 mL ; une heure à 37°C) et de DNase I (10 mg/20 mL ; une heure à 37°C). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 14.000 g pendant 20 minutes afin de séparer le contenu cellulaire (surnageant) des corps d'inclusion (culot). Ceux-ci sont ensuite lavés en réalisant deux cycles "solubilisation-centrifugation" dans un tampon de lavage (50 mL ; 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 500 mM NaCl, 2% Triton X-100). Finalement, les protéines d'intérêt sont récupérées par solubilisation des corps d'inclusion dans un tampon contenant de l'urée à forte concentration (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 8 M urée).

2.2.2 Purification

Méthode. La technique de chromatographie échangeuse d'anions est utilisée pour purifier les corps d'inclusion. Le principe consiste à séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). Dans le cas de l'Omp2a, le pI calculé (ExpASy [Wilkins *et al.*, 1999]) est compris entre 4.5 et 5.0. En travaillant dans un milieu dont le pH est fixé à 8.0, la protéine d'intérêt est donc globalement chargée négativement se liant ainsi à la matrice d'une colonne d'agarose portant des charges positives (groupes diéthyle ammonium). Les différentes protéines issues des corps d'inclusion sont éluées de la colonne par un gradient en NaCl libérant des ions Cl⁻ qui entreront en compétition avec les protéines permettant ainsi leur élution.

Paramètres expérimentaux. Les protéines solubilisées dans le tampon urée (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 8 M urée) sont chargées (1.0 mL/minute) sur une colonne échangeuse d'anions (HiTrap DEAE FF ; GE Healthcare). L'élution est obtenue par un gradient en NaCl (de 20 à 800 mM sur

50 mL) et des fractions de 1 mL sont récoltées et chargées sur gel SDS/PAGE 12% afin d'identifier celles qui contiennent l'Omp2a.

2.2.3 Repliement

Mise en évidence. Les protéines membranaires en tonneaux β ont pour particularités (i) de résister à la dénaturation induite par le SDS [Debnath *et al.*, 2010, Nielsen *et al.*, 2007, Tulumello et Deber, 2012, Manning et Colon, 2004]. Un échantillon natif chargé sur un gel SDS-PAGE ($\pm 1\%$ SDS) ne sera donc pas dénaturé. Dans le cas de l'Omp2a, il sera donc possible de distinguer les échantillons préalablement dénaturés monomériques (37 kDa) des échantillons repliés sous la forme de trimères (120 kDa).et (ii) de présenter un déplacement électrophorétique sur gel SDS-PAGE [Burgess *et al.*, 2008]. En effet, la forme native des protéines est plus compacte que la forme dénaturée et aura tendance à migrer plus rapidement que l'espèce dépliée sur un gel. Il sera donc possible de discerner la forme dénaturée ou pas des monomères de l'Omp2a.

Paramètres expérimentaux. Après l'étape de purification, l'Omp2a est stockée dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.0, approximativement 250 mM NaCl et 8 M urée. Afin de permettre le repliement de la protéine, l'urée (qui dénature les protéines [Candotti *et al.*, 2013]) doit être éliminée et remplacée par le détergent. Les échantillons (2.5 mL) sont donc chargés sur une colonne de dessalage (PD-10; GE Healthcare) et le tampon contenant l'urée est remplacé par un tampon (3.5 mL) contenant le SDS (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 120 mM SDS). Le repliement des protéines est ensuite induit par dilution des échantillons dans un tampon contenant le cosolvant (MPD). Différentes dilutions ont permis de cribler le ratio SDS/MPD tout en conservant une concentration finale en protéines de 0.5 mg/mL. Le processus de repliement est mis en évidence par migration sur gel SDS-PAGE des échantillons (non-chauffés).

2.2.4 Dichroïsme circulaire

Méthode. Le DC est une spectroscopie d'absorption dans l'UV proche et lointain qui fournit des informations sur la structure des macromolécules biologiques. En effet, les molécules chirales absorbent différemment une onde polarisée circulaire gauche et une onde polarisée circulaire droite. La technique de DC permet de mesurer cette différence. Dans le cas des protéines, le chromophore est le groupement amine impliqué dans le lien peptidique et situé entre deux carbones asymétriques (les carbones alpha des deux acides aminés voisins). En fonction de la structure secondaire (hélice α ou feuillets β par exemple), les groupements peptidiques sont orientés suivant des angles phi et psi caractéristiques résultant en une absorbance des ondes polarisées circulairement spécifiques. L'allure des spectres DC varie donc suivant la composition en structures secondaires. L'utilisation de cette méthode permet donc d'identifier la présence ou non de structures secondaires en fonction des conditions et donc de discerner l'état natif ou déplié d'une protéine.

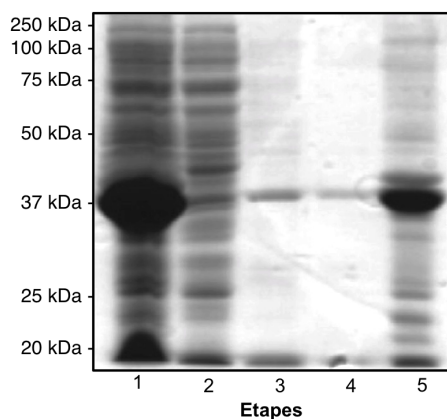


Figure 2.2 – Surexpression de l’Omp2a en corps d’inclusion suivie par gel SDS/PAGE 15%. 1 ; Lysat cellulaire. 2-4 ; Surnageant après étapes de lavage. 5 ; Solubilisation dans 8 M urée.

Paramètres expérimentaux. Les mesures de dichroïsme circulaire (DC) sont réalisées sur un spectropolarimètre Jasco J-810. Les échantillons (0.1 mg/mL) sont préparés dans 50 mM tampon phosphate pH 10, 800 mM NaF (remplaçant le NaCl interférant avec les mesures DC), 60 mM SDS et 1.5 M MPD. Les spectres sont acquis à une vitesse de 10 nm min⁻¹ avec une résolution de 0.2 nm et un temps d’intégration de 4 secondes. La moyenne de 4 accumulations est réalisée et les spectres correspondant aux références (en absence de protéine) sont soustraits de la moyenne.

2.3 Résultats

2.3.1 Surexpression protéique et purification

Les étapes de production et de lavage des corps d’inclusion sont suivies par migration sur gel SDS/PAGE (Figure 2.2). Ainsi, après les étapes de lyse cellulaire et de dégradation de l’ADN, la présence de l’Omp2a est confirmée par une bande d’un poids moléculaire apparent correspondant à l’Omp2a (Etape 1 ; 37 kDa) ; bien que de nombreuses protéines contaminantes soient encore présentes (observées sur gel par les différentes bandes apparaissant à des masses moléculaires différentes de l’Omp2a). Une première étape de centrifugation permet de séparer les corps d’inclusion (culot) des protéines bactériennes solubles (surnageant). On observe ainsi sur gel que de nombreuses protéines contaminantes sont éliminées lors de cette étape (2). Deux cycles de “solubilisation-centrifugation” dans un tampon de lavage contenant le détergent Triton X-100 ont permis d’éliminer les dernières protéines bactériennes (Etapes 3 et 4). Finalement, l’Omp2a sera récupérée en solubilisant les corps d’inclusion une nuit dans un tampon contenant une forte concentration en urée (Etape 5).

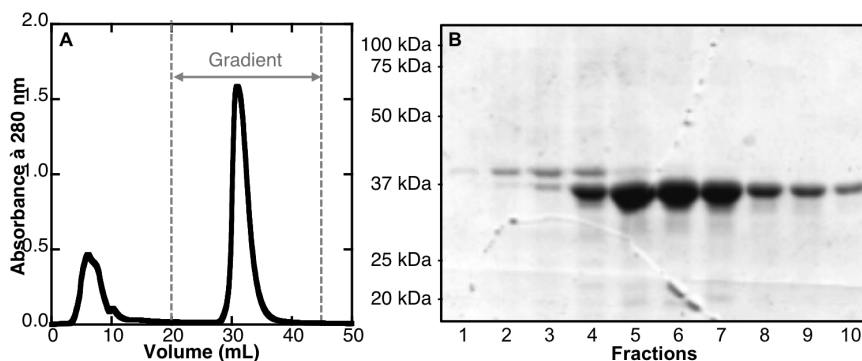


Figure 2.3 – Purification de l’Omp2a par chromatographie échangeuse d’anion (DEAE). (A) Chromatogramme à la sortie de la colonne échangeuse d’anions. (B) Fractions récoltées lors du gradient en NaCl observées sur gel SDS/PAGE 12%.

Malgré les différentes étapes de lavage des corps d’inclusion, l’échantillon obtenu après solubilisation dans l’urée n’est pas suffisamment pur, tel que montré sur la Figure 2.2 (Etape 5) où, en plus de notre bande d’intérêt à 37 kDa, de nombreuses bandes sont en effet encore observées. Le repliement de protéines est un processus complexe demandant des échantillons homogènes (qui ne contiennent que notre protéine d’intérêt). Afin de minimiser les perturbations dues à des protéines contaminantes [Booth, 2003], une étape de purification est nécessaire. L’Omp2a présentant un point isoélectrique (pI) théorique compris entre 4.5 et 5.0 (calculé via ExPASy [Wilkins *et al.*, 1999]), il est possible de la purifier par chromatographie échangeuse d’anions. Les échantillons solubilisés dans l’urée ont donc été chargés sur une colonne DEAE. Les protéines neutres ou chargées positivement n’interagissent pas avec la matrice de la colonne et sont donc directement éluées, tel qu’observé par un premier pic d’absorbance sur la Figure 2.3 A. Un gradient linéaire en NaCl allant de 20 mM à 800 mM est ensuite appliqué sur la colonne afin de décrocher séquentiellement les protéines liées à la matrice. Les fractions correspondant au second pic d’éluion sont alors chargées sur gel SDS-PAGE 12% permettant d’identifier celles qui contiennent notre protéine d’intérêt (Voir Figure 2.3 B). Ainsi, les fractions 5 à 10 contenant exclusivement notre protéine d’intérêt sont rassemblées et stockées. A partir d’un litre de culture, 36 ± 8 mg de corps d’inclusion ont été produits. Après les deux étapes de lavage, environ 28 ± 4 mg de protéines non purifiées ont pu être récupérés.

2.3.2 Optimisation du ratio détergent/cosolvant

Afin de déterminer les concentrations optimales en détergent et cosolvant pour induire le repliement de l’Omp2a, la protéine a été renaturée dans différentes proportions en SDS (de 0 à 100 mM) et MPD (de 0 à 2.5 M). Les échantillons protéiques obtenus après la purification sont stockés dans un tam-

Table 2.1 – Rendement de production, purification et repliement de l’Omp2a.

Etape	Quantité (mg)	Etat
Corps d’inclusion bruts	36±4	Dénaturé
Lavage (1/2)	30±4	Dénaturé
Lavage (2/2)	28±4	Dénaturé
Protéine solubilisée	27±4	Dénaturé
Protéine purifiée	19±7	Dénaturé
Renaturation	15±5	Natif

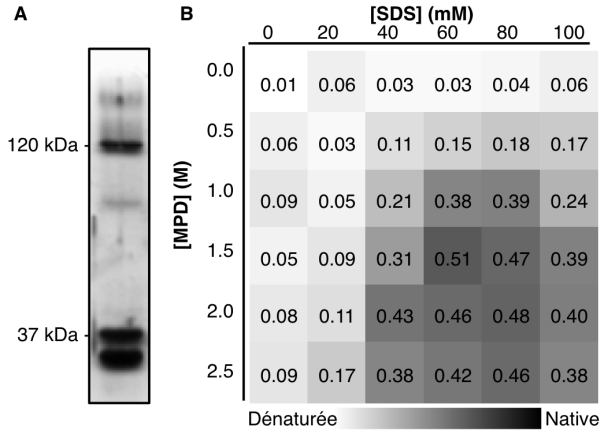


Figure 2.4 – Repliement de l’Omp2a en présence de différents ratio de SDS/MPD. (A) Gel SDS-PAGE 15% mettant en évidence les différentes espèces obtenues après 48 heures de repliement. (B) Criblage des concentrations en SDS et en MPD afin d’optimiser le rendement de repliement (déterminé par densitométrie). Les valeurs reprises dans le tableau correspondent à la fraction repliée après 72 heures d’incubation à température ambiante.

pon contenant de l'urée à forte concentration (8 M) pouvant interférer avec le processus de renaturation [Candotti *et al.*, 2013], un changement de tampon est donc nécessaire afin de remplacer l'urée par le SDS. Les échantillons ont donc été transférés dans un tampon contenant du SDS (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 120 mM SDS) à l'aide d'une colonne de dessalage. Les différentes concentrations en SDS et MPD sont ensuite obtenues par dilution (excepté pour les échantillons sans détergent où un deuxième échange de tampon est nécessaire). Après 72 heures de renaturation à température ambiante, les échantillons sont chargés sur gel SDS/PAGE 15% (la résolution des gels n'est pas suffisante à 12% suite à la présence de détergent interférant avec la migration [Rath *et al.*, 2009a]) afin de visualiser l'efficacité de renaturation (Voir Figure 2.4 **A**). Trois espèces sont observées : (i) l'Omp2a dénaturée ayant un poids moléculaire apparent de 37 kDa, (ii) l'Omp2a repliée sous sa forme monomérique apparaissant à un poids moléculaire légèrement inférieur au monomère dénaturé. En effet, en se repliant, le monomère adopte une conformation moins volumineuse expliquant la faible différence de poids moléculaire observée [Roussel *et al.*, 2012, Rath *et al.*, 2009a], (iii) l'Omp2a repliée sous sa forme trimérique ayant un poids moléculaire d'environ 120 kDa.

Pour chaque ratio SDS/MPD, la fraction native (correspondant exclusivement à l'espèce trimérique) de l'échantillon peut être déterminée par densitométrie sur gel [Collins, 2007] en utilisant l'équation suivante :

$$Fraction\ native = \frac{trimères}{monomères + monomères\ renaturés + trimères}$$

La figure 2.4 **B** rassemble toutes les valeurs obtenues sous la forme d'un tableau. Comme attendu, en présence du détergent seul (première ligne), le repliement n'a pas lieu et l'espèce trimérique n'est pas observée. Le SDS est en effet bien connu pour induire le dépliement des protéines, même à faible concentration [Andersen *et al.*, 2009, Bhuyan, 2010, Nielsen *et al.*, 2007]. De la même manière, le MPD n'est pas capable, seul, d'induire le repliement de l'Omp2a (première colonne). Bien que ce cosolvant soit connu pour interagir très étroitement avec les protéines [Anand *et al.*, 2002], au point d'être régulièrement observé dans les structures cristallographiques [Cuesta-Seijo *et al.*, 2010, Fujimoto *et al.*, 2013, Michaux *et al.*, 2008b], et pour stabiliser la forme native de protéines [Huang *et al.*, 2011, Tanaka *et al.*, 2011], il ne semble pas capable d'induire spontanément le repliement de protéines membranaires. L'efficacité du repliement de l'Omp2a est donc uniquement possible en associant le détergent et le cosolvant. En effet, on observe que de nombreuses combinaisons mènent à la renaturation de l'Omp2a avec un optimum à 60 mM SDS et 1.5 M MPD où la moitié de l'échantillon est repliée. Il est intéressant de noter que ce sont des concentrations millimolaires en SDS et molaires en MPD qui induisent le repliement de l'Omp2a, en accord avec les concentrations précédemment observées en présence de protéines solubles et membranaires [Michaux *et al.*, 2008a]. De plus, il semblerait que le rapport SDS/MPD ne soit pas le seul paramètre ayant un effet sur l'efficacité de renaturation. En effet, bien que certains rapports SDS/MPD soient identiques (par exemple la diagonale du tableau),

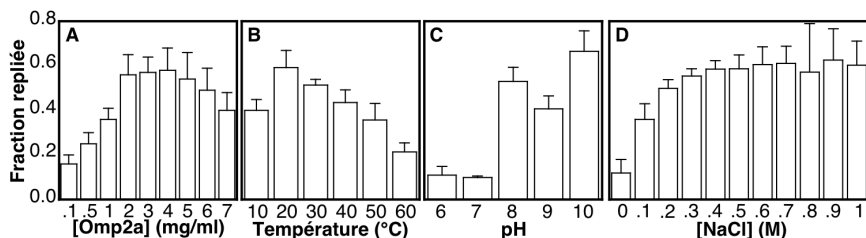


Figure 2.5 – Influence des paramètres physico-chimiques sur le repliement de l’Omp2a après 48 heures. Effets (A) de la concentration en protéine, (B) de la température, (C) du pH et (D) de la concentration en sel. Les valeurs affichées sont obtenues après analyse par densitométrie de gels SDS/PAGE 15%. Les barres d’erreurs correspondent à trois échantillons indépendants.

les fractions natives ne sont pas identiques. Il semblerait donc qu’une quantité minimale de SDS (40 mM) soit nécessaire pour permettre le repliement. Dans le cas des protéines membranaires, des concentrations élevées en SDS sont en effet nécessaires pour maintenir les protéines sous une forme soluble et ainsi éviter les phénomènes d’aggrégation [Watarai *et al.*, 2000].

2.3.3 Influence des paramètres physico-chimiques sur le repliement de l’Omp2a

Différents paramètres physico-chimiques (concentration en protéine, température, pH, et concentration en sel) ont été individuellement étudiés afin de déterminer leurs effets sur le mécanisme de renaturation ainsi que les conditions menant à la fraction native la plus élevée (Figure 2.5).

Les protéines membranaires possèdent de nombreuses régions hydrophobes (transmembranaires) qui augmentent considérablement les risques de précipitation, les études de repliement se limitent habituellement à de faibles concentrations en protéines (typiquement de 0.1 à 1 mg/mL) [Batas *et al.*, 1999, Goldberg *et al.*, 1991]. Dans notre cas, les fractions natives les plus élevées (>55 %) sont observées à de plus hautes concentrations en protéines (de 2 à 7 mg/mL) avec un optimum ($59 \pm 9\%$) à 4 mg/mL (Figure 2.5 A) à température ambiante dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 60 mM SDS et 1.5 M MPD. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus en présence d’un détergent classique, le n-dodécyle- β -D-maltopyranoside (DDM), où l’Omp2a était repliée de façon optimale à faibles concentrations (de 0.1 à 1 mg/mL [Roussel *et al.*, 2012]), indiquant que le système SDS/MPD permet de replier les protéines membranaires à plus haute concentration en protéines que la méthode classique, probablement grâce aux propriétés solubilisantes du SDS [Chuang *et al.*, 2011, Keller *et al.*, 2006, le Maire *et al.*, 2000, Rath *et al.*, 2009a]. Cet avantage devrait faciliter les études structurales impliquant de la cristallogénèse nécessitant de travailler à haute concentration en protéines.

Dans le cas de protéines membranaires, la température est un facteur clé du processus de renaturation affectant souvent négativement les rendements

de renaturation [Burgess *et al.*, 2008]. Ainsi, pour d'autres protéines membranaires en tonneaux β similaires (OmpF et Omp85), les protéines ont tendance à s'aggréger et à précipiter à des températures supérieures à 50°C [Surrey et Jähnig, 1995, Surrey *et al.*, 1996]. Afin d'étudier l'effet de la température sur la renaturation d'une protéine en présence du couple SDS/MPD, l'Omp2a a été repliée (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 60 mM SDS et 1.5 M MPD) à des températures variant de 10 à 60°C (Figure 2.5 B). Le rendement optimal ($59 \pm 8\%$) est obtenu à température ambiante (20°C). Néanmoins, on observe une fraction native non négligeable ($19 \pm 7\%$) à haute température (60°C) en présence du couple détergent/cosolvant, suggérant un effet stabilisateur.

In vivo, les protéines de la membrane externe des bactéries sont repliées directement dans le périplasme où le pH est déterminé par l'environnement extracellulaire [Wilks et Slonczewski, 2007]. Bien que l'effet général du pH soit peu connu, il semblerait que, dans des conditions identiques, le repliement des protéines membranaires en tonneaux β soit favorisé à des pH basiques [Burgess *et al.*, 2008, Huysmans *et al.*, 2007, Surrey *et al.*, 1996, Tamm *et al.*, 2004]. Afin de tester l'influence de ce paramètre sur le repliement en présence du couple SDS/MPD, l'Omp2a a été incubée dans différents tampons (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 60 mM SDS et 1.5 M MPD) avec des valeurs de pH variant de 6 à 10 (Figure 2.5 C). Comme attendu, les conditions à pH basique ont mené aux meilleurs rendements de renaturation (jusqu'à $67 \pm 9\%$ à pH 10).

La concentration en sel, et donc la force ionique, peut affecter le détergent en interagissant avec le groupement sulfate positivement chargé du SDS [Hayashi et Ikeda, 1980, Chen *et al.*, 1986], les interactions protéine-détergent en affectant principalement la taille et la forme des micelles [Negin et Carbeck, 2002, Otzen, 2002, Nielsen *et al.*, 2007] et la solubilité des protéines [Ruckenstein et Shulgin, 2006]. Afin d'étudier l'effet du sel sur le mécanisme de renaturation induit par le système SDS/MPD, l'Omp2a a été incubée dans des tampons de renaturation (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 60 mM SDS et 1.5 M MPD) dont la concentration en sel varie de 0 à 1 M NaCl. Comme observé sur la Figure 2.5 D, le rendement de renaturation augmente avec la concentration en sel jusqu'à atteindre un plateau à partir d'une concentration en NaCl de 400 mM. Habituellement, une trop forte concentration en sel diminue la solubilité des protéines menant à leur précipitation. Dans notre cas, le SDS joue certainement le rôle d'agent solubilisant tel que mentionné préalablement.

Le repliement optimal et complet de l'Omp2a a finalement été obtenu en combinant l'ensemble des paramètres physico-chimiques préalablement optimisés. Ainsi, l'Omp2a (4 mg/mL) a pu être repliée dans un tampon de renaturation optimal (50 mM Tris-HCl pH 10, 800 mM NaCl, 60 mM SDS et 1.5 M MPD) en 4 jours à 60°C tel qu'observé sur la Figure 2.7 A. Bien que le processus de renaturation *in vitro* soit plus long qu'en condition *in vivo* (de l'ordre de la seconde [Reid *et al.*, 1988]), il est dans le même ordre de grandeur que d'autres expériences impliquant des protéines membranaires en tonneaux β [Kleinschmidt et Tamm, 1996, Kleinschmidt, 2003, Watanabe et Inoko, 2009]. Des échantillons de l'Omp2a dénaturée par le SDS (0 jour; échantillon directement congelé après mise en contact avec le MPD) et repliée en présence du détergent et du cosolvant (4 jours) ont été analysés par di-

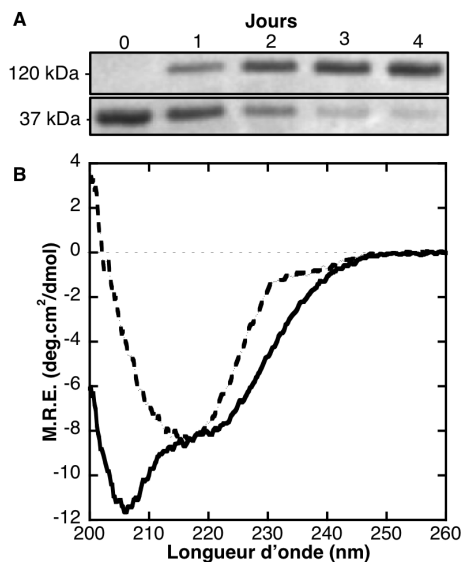


Figure 2.6 – Repliement de l’Omp2a. (A) Suivi de la renaturation par gel SDS/PAGE 15 % différents jours après l’induction du processus de repliement par ajout du cosolvant. (B) Spectre DC en UV lointain d’un échantillon dénaturé (ligne pleine) et d’un échantillon complètement replié (ligne discontinue).

chroïsme circulaire afin de caractériser leurs structures secondaires respectives (Figure 2.7 B). Ainsi, alors que le spectre correspondant à la protéine dénaturée par le SDS (ligne pleine) se distingue par la présence de deux minima à 208 et 222 nm, reflétant une structure en hélices α caractéristique des protéines dénaturées par le SDS [Manning et Colon, 2004, Mattice *et al.*, 1976, Nielsen *et al.*, 2007, Bhuyan, 2010], l’échantillon renaturé présente un spectre (ligne discontinue) possédant un seul pic négatif aux alentours de 218 nm, typique des protéines en brins β . Ce spectre est très similaire à ceux obtenus pour l’Omp2a repliée dans le DDM [Roussel *et al.*, 2012] ou d’autres porines bactériennes [Siritapetawee *et al.*, 2004, Visudtiphole *et al.*, 2005]. Le passage d’une structure en hélices α à une structure en tonneaux β est dû à l’action du MPD. En effet, il semblerait que ce dernier interagisse principalement avec le SDS [Michaux *et al.*, 2008a], minimisant les interactions dénaturantes entre le SDS et la protéine [Gudiksen *et al.*, 2006] permettant d’induire la renaturation. Toutefois, comme montré à la Figure 2.4 B où le repliement n’est pas possible en présence du MPD seul, le SDS reste nécessaire au mécanisme de renaturation et doit donc encore interagir avec l’Omp2a en présence de MPD.

2.3.4 Investigation autour du carbone asymétrique du MPD

Le MPD est une molécule possédant un carbone asymétrique. Les énantiomères pouvant avoir un effet différent, il serait intéressant de pouvoir mettre

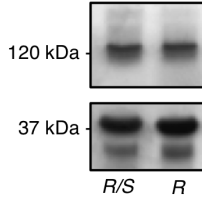


Figure 2.7 – Mise en évidence de l’effet du mélange racémique ou de l’énantiomère *R* sur le repliement de l’Omp2a en présence de SDS par migration sur gel SDS/PAGE 15 %.

en évidence la capacité des différents énantiomères à induire le processus de repliement. Commercialement, il est possible d’obtenir le mélange racémique (*R/S*, utilisé dans les études précédentes) et l’énantiomère “*R*”. L’Omp2a, préalablement solubilisée dans le SDS (60 mM), a donc été mise en présence du cosolvant racémique ou *R* et le repliement a été suivi par gel SDS/PAGE (Figure ??). On n’observe pas de différence entre les deux échantillons. En effet, l’intensité des bandes correspondant à la forme trimérique de l’Omp2a (120 kDa) ou monomérique repliée (< 37 kDa) est identique pour les deux conditions. Cette observation indique que l’énatiomère *R* est capable, seul, d’induire le repliement de l’Omp2a. Il se pourrait toutefois que la forme *S* ne soit pas capable d’induire ce processus. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de pouvoir séparer, à partir du mélange racémique, les deux isomères.

2.3.5 Effet de différents alcools sur le repliement en présence de SDS

Le mécanisme par lequel le MPD permet de replier des protéines en présence de SDS n’est pas encore compris. Il a été montré que certains alcools sont capables d’interagir avec le SDS et de modifier ses propriétés micellaires telles la taille et la forme des micelles, bien que l’on ne connaisse pas les mécanismes associés [Akhter, 1999, Bolkhuis *et al.*, 2004, Forland *et al.*, 1994, Safarpour *et al.*, 1999, Stilbs, 1982]. Afin d’identifier les alcools capables d’induire la renaturation de la protéine en présence de SDS, l’Omp2a a été incubée dans différents tampons SDS/alcool dans les conditions (A) déterminées comme optimales (50 mM Tris-HCl pH 10, 800 mM NaCl, 60 mM SDS et 1.5 M MPD), ou (B) préalablement utilisées (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 60 mM SDS et 1.5 M MPD) en présence de PagP, une autre protéine membranaire en tonneaux β [Michaux *et al.*, 2008a] (Figure 2.8 **A** et **B** respectivement). Puisque nous avons montré plus haut que la différence de pH (8 versus 10) n’avait pas un impact significatif sur le repliement de la protéine, la concentration en NaCl (800 versus 150 mM) est la principale différence entre les deux jeux d’échantillons. Quatre catégories d’alcools sont observées : (i) les alcools qui ne sont pas capables de changer les propriétés dénaturantes du SDS et d’induire la renaturation de l’Omp2a ; (ii) les alcools capables de replier (partiellement ou complètement) la protéine, indépendamment de la concentration en sel ; (iii)

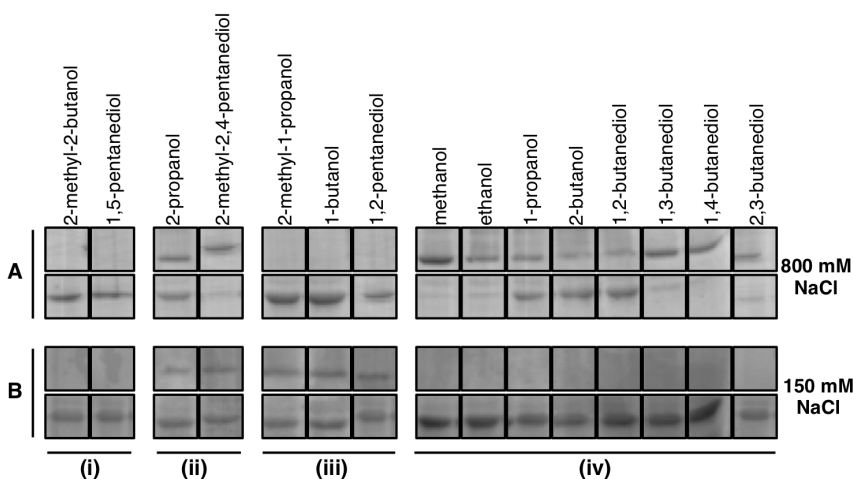


Figure 2.8 – Mise en évidence par migration sur gel SDS/PAGE 15% de la capacité de certains cosolvants (1.5 M) à induire le repliement de l’Omp2a (4 mg/mL) en présence de SDS (60 mM) dans un tampon contenant (A) 800 mM NaCl ou (B) 150 mM NaCl. Le processus de repliement est observé par la présence de l’espèce trimérique de l’Omp2a (bande à 120 kDa, cadre supérieur).

les alcools ayant un effet sur le détergent à faible ou (iv) à forte concentration NaCl. Il est intéressant de noter la complexité du système. En effet, des alcools dont la structure est très différente (nombre de groupements hydroxyles, longueur de la chaîne alkyle) peuvent mener à des résultats similaires (par exemple le 2-propanol et le MPD) alors que des alcools structurellement proches peuvent induire des résultats différents (2-méthyl-butanol et 2-butanol). De même, l’influence de la force ionique semble jouer un rôle important puisque la majorité des alcools permettent d’induire la renaturation de l’Omp2a en présence d’une forte concentration en NaCl. Par exemple, le méthanol n’induit pas du tout le repliement de l’Omp2a à faible force ionique, alors que l’échantillon est complètement renaturé à haute concentration en sels. Malgré la prise en considération de nombreux paramètres (nombre de groupements hydroxyles, longueur de la chaîne carbonée, surface polaire/apolaire, ...), il n’a pas été possible de dégager une tendance permettant d’expliquer pourquoi certains alcools sont capables d’inverser les propriétés dénaturantes du SDS et d’autres non.

2.4 Conclusions

Pour la première fois, une protéine membranaire multimérique a pu être repliée à partir de corps d’inclusion par la méthode originale associant le SDS et le MPD supportant ainsi la transférabilité de la méthode à des cas membranaires complexes. Dans un premier temps, l’importance du ratio SDS/MPD a été mise en évidence en incubant l’Omp2a dans différents mélanges combi-

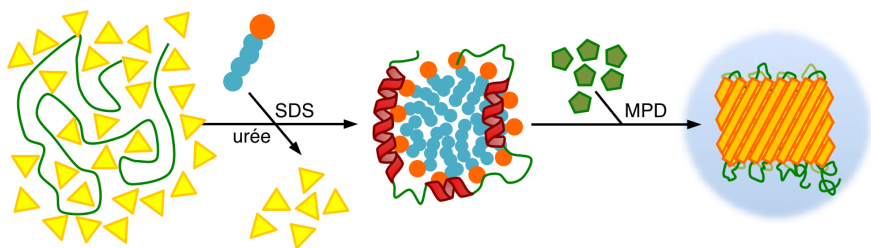


Figure 2.9 – Représentation schématique du repliement de l’Omp2a en présence du binaire SDS/MPD. Dans un premier temps, l’urée (triangles jaunes) est remplacée par le SDS, menant à une structure contenant des hélices α non natives. L’ajout de MPD (pentagones verts) permet de récupérer la structure native trimérique.

nant le SDS (de 0 à 100 mM) et le MPD (de 0 à 2.5 M). Il a été démontré que séparément, ni le détergent, ni le cosolvant ne sont capables d’induire la renaturation de la protéine, mais qu’associés, l’Omp2a pouvait récupérer sa structure native trimérique. Comme précédemment observé [Michaux *et al.*, 2008a], des concentrations, respectivement, millimolaires et molaires en SDS et MPD sont nécessaires pour induire le mécanisme de renaturation, suggérant la transférabilité de cette méthode à d’autres protéines. L’étude de l’influence de l’environnement physico-chimique (concentration en protéine, température, pH et force ionique) sur les rendements de renaturation a permis d’identifier certaines conditions favorables au repliement de l’Omp2a. Ainsi la protéine a pu être complètement repliée en 4 jours et passer d’une structure induite par le SDS en hélices α à une structure trimérique en tonneaux β tel que représenté à la figure 2.9.

Le mécanisme par lequel le MPD est capable d’inverser les propriétés dénaturantes du SDS en faveur de nouvelles propriétés renaturantes n’est pas encore connu. Toutefois, en faisant intervenir différents alcools à différentes concentrations en NaCl, nous avons pu mettre en évidence la complexité de ce système dépendant notamment (i) de la nature du cosolvant puisque certains alcools ne sont pas capables d’inverser les propriétés dénaturantes du SDS, alors que d’autres le sont ; et (ii) de la concentration en sel puisque la majorité des alcools sont capables d’induire le repliement de l’Omp2a uniquement en présence d’une forte concentration en NaCl ; bien que certains alcools présentent un comportement opposé (renaturation uniquement à faible concentration en sel) ou différent (permettent le repliement indépendamment de la force ionique).

Déplieement de peptides modèles en présence de Sodium Dodécyle Sulfate

3.1 Introduction

3.1.1 Dénaturation par le sodium dodécyle sulfate

Malgré que le sodium dodecyl sulfate (SDS) soit le détergent le plus utilisé dans les laboratoires de biochimie, la manière dont il interagit avec les protéines et comment il induit leur dénaturation sont deux processus peu connus, bien que largement étudiés [Mattice *et al.*, 1976, Gudiksen *et al.*, 2006, Nielsen *et al.*, 2007, Schneider *et al.*, 2008, Andersen *et al.*, 2009, Bhuyan, 2010, Dutta *et al.*, 2010a, Dutta *et al.*, 2010b, Naidu et Prabhu, 2011, Krishnamani *et al.*, 2012, Bello *et al.*, 2012]. Ainsi, la nature des interactions protéine-détergent est encore sujette à discussion : est-elle ionique/polaire (avec le groupement sulfate) ? Hydrophobe (avec la chaîne alkyle) ? Une combinaison ? Dans quelles proportions ? De plus, puisque le détergent peut spontanément s'auto-assembler en micelles au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC), la nature des interactions avec les protéines peut changer en fonction de la concentration en SDS [Gudiksen *et al.*, 2006, Andersen *et al.*, 2009, Moriyama *et al.*, 2012]. En effet, alors que le monomère présente une partie polaire et une autre apolaire (qui peuvent entrer en contact avec les protéines via des interactions polaires et/ou hydrophobes respectivement), la micelle ne présente au solvant (et donc aux protéines en solution) qu'une surface polaire riche en charges négatives et les premières interactions avec la protéine se font donc logiquement avec la tête polaire du détergent.

En dessous de la CMC, les interactions avec les protéines seraient majoritairement de type hydrophobe [Bhuyan, 2010, Naidu et Prabhu, 2011]. En effet, la

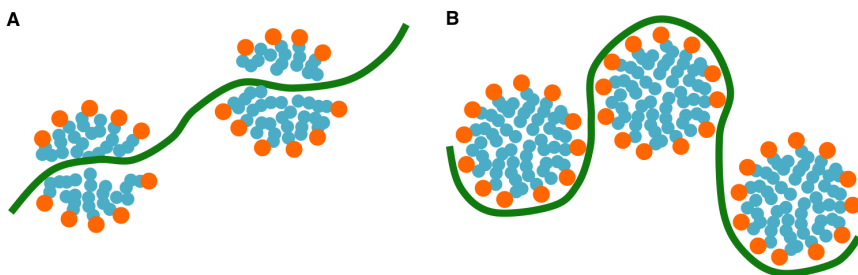


Figure 3.1 – Modèles d’interaction entre une protéine et une micelle en (A) “collier de perles” où les micelles se forment au niveau des régions hydrophobes de la protéine et en (B) “emballage” où la protéine s’enroule autour des micelles.

tête négativement chargée du SDS se lierait d’abord avec des acides aminés basiques en surface des protéines, favorisant ensuite l’agrégation d’autres molécules de détergent par des interactions lipophiles. Les interactions ioniques et hydrophobes semblent donc co-exister dans le mécanisme de dénaturation des protéines, bien que la majeure contribution puisse être attribuée à la partie apolaire de la molécule de SDS. Certaines études ont en effet montré que des protéines modifiées dont la surface accessible au solvant est exclusivement chargée négativement (repoussant donc les têtes des molécules de détergent) sont également dénaturées par le SDS, mettant ainsi en évidence la capacité de la chaîne apolaire du détergent à se lier aux protéines par des interactions hydrophobes indépendamment de la tête polaire [Bhuyan, 2010, Hu *et al.*, 2011]. La dénaturation des protéines serait due à des répulsions “charge-charge” entre (i) les différentes molécules de détergent liées à la protéine et (ii) certaines molécules de SDS et des résidus chargés négativement [Otzen, 2002]. En effet, en s’agrégeant sur les régions hydrophobes de la protéine par leur partie apolaire, les molécules de SDS amènent de plus en plus de charges négatives qui ne peuvent plus être compensées par les résidus chargés positivement de la protéine. La répulsion entre les molécules de SDS induirait le dépliement de la protéine [Bhuyan, 2010].

Au-dessus de la CMC, deux modèles d’interactions avec les protéines sont proposés (Figure 3.1) : (A) Le modèle en “collier de perles” où les régions hydrophobes de la protéine servent de points d’ancrage aux micelles [Turro et Lei, 1995] et (B) le modèle “d’emballage” où la chaîne polypeptidique s’enroule autour des micelles [Valstar *et al.*, 1999]. Dans le premier cas, la protéine traverse la micelle, tandis que dans le second, elle reste en surface. Actuellement, les deux modèles ont été validés sur différentes protéines [Wang *et al.*, 2010, Misra et Kishore, 2011, Tulumello et Deber, 2011, Domínguez, 2011, Shaw *et al.*, 2011, Bello *et al.*, 2012, Shaw *et al.*, 2012] suggérant que l’interaction pourrait être dépendante de la structure de la protéine et donc de sa séquence [Moriyama *et al.*, 2012]. Quel que soit le modèle, des micelles chargées négativement se retrouvent liées à la protéine (autour ou en surface) et la répulsion entre elles

serait responsable de la dénaturation des protéines [Bhuyan, 2010].

Quelques études théoriques ont été menées sur le système SDS-protéine. L'utilisation de la méthode d'amarrage moléculaire ("docking") impliquant une molécule de SDS et la β -lactoglobuline (une protéine soluble majoritairement constituée de feuillets β formant une sorte de tonneau) a permis d'identifier certains sites d'interaction avec le détergent [Hu *et al.*, 2011, Bello *et al.*, 2012]. Toutefois, ces études restent limitées à l'utilisation d'un très faible nombre de molécules de détergent (une ou deux) dans une situation où la protéine est figée, limitant ainsi les possibilités d'interactions. D'autres études impliquant la technique de la dynamique moléculaire (DM) ont démontré l'importance de la présence de résidus aromatiques pour la formation d'une micelle en surface d'un peptide modèle en épingle β [Jalili et Akhavan, 2011] et le rôle clé des résidus chargés positivement dans l'interaction avec la surface micellaire [Krishnamani *et al.*, 2012]. Le dépliement de protéines en présence de SDS est un processus particulièrement difficile à modéliser [Day et Daggett, 2003]. En effet, la présence de nombreuses molécules de détergent pouvant interagir entre elles ou avec la chaîne polypeptidique, la complexité des protéines (nombres d'acides aminés, présence de différentes structures secondaires) et du mécanisme de dépliement (nombreux intermédiaires, différentes voies possibles) sont autant de facteurs qui expliquent le nombre limité d'études théoriques sur ce système actuellement. Afin de pallier ce problème, il est possible de travailler avec des peptides qui présentent comme avantages (i) de disposer d'une structure plus simple que les protéines (souvent une seule hélice α ou un feuillet β), (ii) une voie de repliement/dépliement sans intermédiaires et (iii) d'une longueur limitée (de l'ordre d'une vingtaine d'acides aminés), rendant possible les études théoriques [Zhang *et al.*, 2009, Rath *et al.*, 2009b, Killian et Nyholm, 2006].

3.1.2 Présentation des peptides solubles modèles

Les peptides Trpcage et Trpzip ont été sélectionnés afin de représenter les deux types de structures secondaires (hélices α et feuillet β , respectivement) présentes au sein des protéines.

Le TrpCage est un peptide soluble de seulement 20 résidus (Figure 3.2, **A**) disposant d'une structure stable en solution à température ambiante [Neidigh *et al.*, 2002]. Malgré sa petite taille, ce peptide présente une structure secondaire bien définie formée d'une hélice α (résidus 1 à 8), d'une hélice de type 3_{10} (11-14) et d'une queue polyproline II (P17-P18-P19) C-terminale (Figure 3.3 **A**). La structure tertiaire du peptide est formée par le repliement de la queue polyproline II le long de l'hélice α formant ainsi un noyau hydrophobe composé

A Trpcage	N-	N	L	Y	I	Q	W	L	K	D	G	G	P	S	S	G	R	P	P	P	S	-C
B Trpzip	N-	S	W	T	W	E	G	N	K	W	T	W	K	-C								

Figure 3.2 – Séquence des peptides TrpCage et TrpZip.

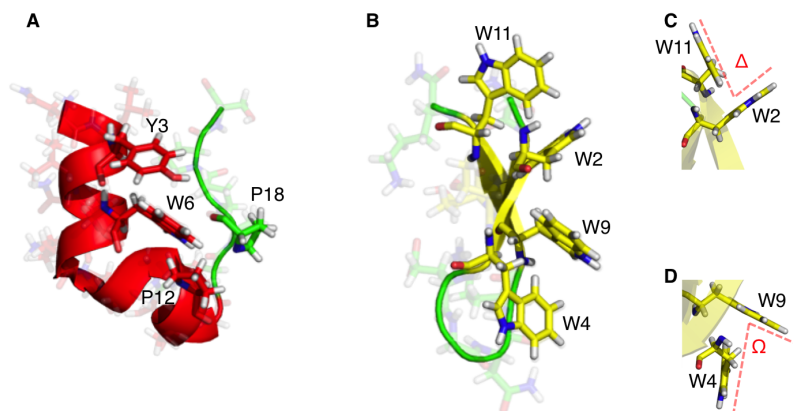


Figure 3.3 – Structures du (A) TrpCage et du (B) TrpZip et de l’organisation particulière des paires de résidus tryptophanes W2W11 (C) et W4W9 (D) organisés les uns par rapport aux autres selon un angle particulier.

de deux résidus aromatiques (Y3 et W6) entourés d’une cage (à l’origine du nom) formée par des résidus prolines (P12 et P18). Un pont salin (D9 - R16) stabilise cette structure tertiaire [Hudaky *et al.*, 2008]. Ce peptide est un candidat idéal pour nos études où nous combinerons des mesures expérimentales à des résultats théoriques. En effet, la présence de l’hélice α peut être étudiée par des mesures en dichroïsme circulaire (DC) [Streicher et Makhataadze, 2007], tandis que la stabilité de la structure tertiaire pourra être mesurée par fluorescence intrinsèque [Iavarone et Parks, 2005, McMillan *et al.*, 2013]. En effet, puisque le Trpcage possède un résidu tryptophane unique (W6) impliqué dans une “cage”, un changement d’exposition au solvant de ce résidu, observé par un changement de comportement en fluorescence, sera le reflet de l’accessibilité au solvant et donc de la perte de la structure tertiaire. Par ailleurs, sa petite taille et la simplicité de son mode de dépliement font que ce peptide est compatible avec des études de dynamique moléculaire [Seshasayee, 2005, Bunagan *et al.*, 2006, Juraszek et Bolhuis, 2006, Paschek *et al.*, 2008, Day *et al.*, 2010].

Bien que le peptide Trpzip ne soit composé que de 12 résidus (Figure 3.2; B [Cochran *et al.*, 2001]) il présente à température ambiante une structure secondaire formée par deux brins β antiparallèles (résidus 2 - 5 et 8 - 11) reliés par une structure en coude (Figure 3.3, B). Cette structure en épingle β est stabilisée par quatre résidus tryptophanes disposés en tirette (“zipper”, d’où le nom) au niveau d’une des faces du peptide, constituant la structure tertiaire. Ces résidus forment deux paires (W2 - W11 et W4 - W9) où les résidus tryptophanes sont alignés les uns par rapport aux autres formant deux angles très spécifiques : Ω et Δ (Figure 3.3, C et D). Cette organisation particulière permet un couplage entre les nuages électroniques des deux résidus aromatiques appelé “exciton” [Roy *et al.*, 2009, Takekiyo *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2010]. Les mesures en DC montrant un signal très particulier associé à l’organisation singulière des résidus tryptophanes [Tanaka *et al.*, 2005], cette technique sera utilisée pour

confirmer la présence ou non de la structure tertiaire ; tandis que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sera utilisée pour étudier la stabilité de la structure en épingle β [Huang *et al.*, 2009]. Comme pour le Trpcage, la structure simple de ce peptide permet d'envisager la modélisation de son comportement en dynamique moléculaire [Settanni et Fersht, 2008, Yang *et al.*, 2004].

3.2 Objectifs et stratégie

L'objectif général de ce chapitre est de caractériser la structure dépliée par le SDS de deux peptides solubles (Trpcage et Trpzip) et d'identifier les interactions peptide-détergent responsables du processus de dénaturation. Dans ce cadre, chaque peptide sera, dans un premier temps, dénaturé expérimentalement sur une large gamme de concentration en SDS couvrant les régions en-dessous et au-dessus de la CMC. L'état dénaturé des peptides sera alors caractérisé par des techniques spectroscopiques telles que la fluorescence intrinsèque, le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge. Des simulations seront ensuite réalisées afin de modéliser le dépliement des peptides et obtenir des structures à l'échelle atomique de l'état dénaturé. Après validation des modèles théoriques par confrontation avec les données expérimentales, ceux-ci nous permettront d'identifier la nature des interactions entre le détergent et le peptide et de proposer un mécanisme de dénaturation.

3.3 Matériel et Méthodes

3.3.1 Diffusion lumineuse dynamique (DLD)

Méthode. La DLD sert à mesurer la taille de particules en solution. Cette technique mesure la diffusion des particules soumises au mouvement brownien et permet de calculer une distribution de tailles des particules au moyen de la relation de Stokes-Einstein :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Ainsi, la DLD permet de mesurer le coefficient de diffusion (D_t) des particules et d'en déterminer le diamètre hydrodynamique (D_h) en fonction de la température (T) et de la viscosité (η) de la solution (k_B = constante de Boltzmann).

Paramètres expérimentaux. Les peptides (0.1 mg/mL) sont solubilisés dans 20 mM de tampon phosphate pH 7.4 (eau milli-Q) et du SDS allant de 0.1 à 4 mM. Avant chaque mesure, les échantillons sont filtrés (Polypropylène ; 0.22 μ m), centrifugés une minute à 14.000 g afin d'éliminer les impuretés qui pourraient affecter les mesures (poussières, particules non solubilisées) et laissés une heure à température ambiante. Les mesures sont réalisées sur un DynaPro

NanoStar à température ambiante à l'aide d'un faisceau laser (658 nm) et la quantité de lumière diffusée est mesurée par un détecteur perpendiculaire au faisceau incident. La dimension des particules obtenue est le résultat de moyennes sur 20 accumulations.

3.3.2 Fluorescence intrinsèque (FI)

Méthode. Le FI est une spectroscopie d'émission dans l'UV qui fournit des informations sur la structure tertiaire des protéines. Cette technique fait intervenir les résidus aromatiques avec une contribution majeure (85 %) du tryptophane [Eftink, 1994]. Lorsqu'exposés à un rayonnement UV (280 nm), les électrons du cycle aromatique passent à un état de plus haute énergie, dit "excité", et ils retombent ensuite à l'état fondamental en libérant l'énergie acquise sous forme de fluorescence. Le tryptophane peut être utilisé comme sonde dans le dépliement/repliement de protéines puisque son comportement en fluorescence varie en fonction de son exposition au solvant. En effet, la longueur d'onde d'émission maximale de fluorescence est d'environ 355 nm lorsque les résidus sont en solution et donc complètement exposés à un environnement polaire, tandis qu'elle se situe aux alentours de 330 nm lorsque les tryptophanes sont complètement enfouis au sein de la structure protéique, à l'abri du solvant. De manière classique, l'utilisation de la spectroscopie FI permet donc de discerner l'état natif d'une protéine (dont les résidus tryptophanes sont localisés au sein de la structure) de son état déplié (où les résidus aromatiques sont exposés au solvant).

Paramètres expérimentaux. Les échantillons peptidiques (0.5 mg/mL) sont préparés dans 20 mM de tampon phosphate pH 7.4 et du SDS allant de 0.1 à 100 mM. Les mesures sont réalisées à température ambiante sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer LS-45 à l'aide de cellules (UVette) ayant un chemin optique de 2 mm. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 280 nm tandis que l'émission de fluorescence est mesurée entre 300 et 500 nm avec une vitesse de 200 nm.min⁻¹ et une résolution de 0.5 nm. Les spectres obtenus pour les références (en absence de peptide) sont soustraits et la moyenne de 3 spectres est réalisée.

3.3.3 Dichroïsme circulaire (DC)

Paramètres expérimentaux. Les peptides (0.1 mg/mL) sont solubilisés dans un tampon contenant 20 mM de tampon phosphate pH 7.4 et différentes concentrations en SDS (de 0.1 à 100 mM). Les mesures sont réalisées sur un spectropolarimètre Jasco J-810. Les spectres sont acquis à une vitesse de 10 nm.min⁻¹ avec une résolution de 0.2 nm et un temps d'intégration de 4 secondes. La moyenne de 4 accumulations est réalisée et les spectres correspondant aux références (en absence de peptide) sont soustraits de la moyenne.

3.3.4 Spectroscopie infrarouge (IR)

Méthode. L'IR est une technique d'absorption de lumière dans la gamme de l'infrarouge par des molécules. En effet, lorsque la longueur d'onde apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration d'un groupement chimique, ce dernier va absorber une partie du rayonnement et il est possible de mesurer une diminution de l'intensité traversant l'échantillon. Dans le cas de l'étude de la structure de protéines, les groupements chimiques suivis correspondent à la fonction amine (N-H) et carbonyle (O=C) du squelette polypeptidique impliqué dans la formation de ponts hydrogènes stabilisant les différentes structures secondaires. Les fréquences de vibration de ces groupements sont répertoriées en 9 "bandes amides" correspondant à différents modes de vibration (élongation, déformation, balancement). En effet, les fréquences de vibrations des groupements de la bande amide (N-H et O=C) seront différentes selon qu'ils soient impliqués dans un pont hydrogène (stabilisant une structure secondaire) ou non. L'utilisation de cette méthode permet donc de confirmer l'état natif ou pas d'une protéine.

Paramètres expérimentaux. Les peptides (10 mg/mL) sont solubilisés dans du D₂O et 20 mM de tampon phosphate deutéré (pH 7). Le SDS (0.1 à 100 mM) est amené par dilution et la concentration finale en peptide est de 5 mg/mL. Les échantillons sont filtrés (Polypropylène; 0.22 µm) et placés dans une cellule démontable constituée de deux fenêtres en CaF₂ séparées par un anneau en téflon (100 µm). Les différents spectres ont été récoltés entre 4000 et 800 cm⁻¹ à une résolution de 4 cm⁻¹ à l'aide d'un spectromètre Bruker Vertex V70 à transformée de Fourier. Pour chaque spectre, 3 accumulations (1024 scans) ont été moyennées.

3.3.5 Dynamique moléculaire

Choix du champ de forces. Toutes les simulations ont été réalisées en utilisant le programme GROMACS (Version 4.5.5.) [Hess *et al.*, 2008]. Une des difficultés en dynamique moléculaire est de choisir un champ de forces adapté aux études envisagées. Parmi les différentes possibilités, la famille "gromos96" regroupe différents champs de forces développés pour modéliser des molécules biologiques (protéines, sucres et ADN principalement) en solution ([Ponder et Case, 2003]). La variante gromos96 53A6 [Oostenbrink *et al.*, 2004] a été sélectionnée pour sa capacité à représenter les protéines et peptides [Oostenbrink *et al.*, 2004] et la possibilité de paramétrer des molécules possédant de longues chaînes aliphatiques [Daura *et al.*, 1998], tel que le SDS. Enfin, ce champ de forces est dit "unifié" permettant de réduire le nombre d'atomes dans le système et ainsi gagner un temps de calcul non négligeable. D'une manière générale, les atomes d'hydrogènes non polaires ne sont pas explicitement représentés. Par exemple, plutôt que de représenter les atomes d'un groupement méthyle séparément (C, H, H, H); ceux-ci seront regroupés en une seule particule (CH₃) dont les propriétés (masse, rayon et charge) correspondent à l'ensemble des atomes impliqués. L'équation ci-dessous correspondant au champ de forces gromos96 53A6 :

$$E_{\text{potentielle}} = \sum_{\text{Liaisons}} \frac{k_b}{4} (b_i^2 - b_0^2) \quad (3.1)$$

$$+ \sum_{\text{Angles}} \frac{k_\theta}{2} (\cos \theta_i - \cos \theta_0)^2 \quad (3.2)$$

$$+ \sum_{\text{Dihedres}} k_\phi (1 + (\cos \phi_i \cos(m_i \phi_0))) \quad (3.3)$$

$$+ \sum_{\text{Impropres}} \frac{k_\theta}{2} (\cos \zeta_i - \cos \zeta_0)^2 \quad (3.4)$$

$$+ \sum_{\text{vanderWaals}} (4\epsilon_{ij} ((\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^{12} - (\sigma_{ij} r_{ij})^6)) \quad (3.5)$$

$$+ \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}} (\frac{1}{R_{ij}} + \frac{\epsilon_{RF} - 1}{2\epsilon_{RF} + 1} \frac{r_{ij}^2}{r_{cutoff}^3}) \quad (3.6)$$

Cette équation reprend différents éléments :

- Le premier terme (3.1) représente l'énergie potentielle d'une liaison covalente entre deux atomes en fonction de son déplacement (b_i) par rapport à la longueur idéale (b_0). La constante de force (k_b) détermine la force de la liaison.
- Le second terme (3.2) est un potentiel associé à la variation de l'angle formé par trois atomes (θ_i) par rapport à un angle idéal (θ_0). La constante de force (k_θ) détermine la rigidité/flexibilité de l'angle.
- Le troisième terme (3.3) prend en considération l'angle de torsion entre des atomes séparés par trois liaisons covalentes. Le mouvement est associé à un angle dièdre (ϕ_i) dont la valeur peut s'éloigner d'une valeur optimale (ϕ_0) sous la contrainte d'une constante de force (k_ϕ).
- Le quatrième terme (3.4) est identique au précédent et permet d'ajouter des contraintes de plan au sein de certaines molécules (cycles, sucres, acides nucléiques).
- L'avant dernier terme (3.5) est un potentiel de Lennard-Jones prenant en compte les interactions dispersives (van der Waals). Ce terme est l'un des plus important dans l'étude de la stabilité des protéines.
- Finalement, le dernier terme prend en considération les interactions électrostatiques entre deux charges via un potentiel de Coulomb. Celui-ci prend en compte la charge (q) des atomes, la constante de permittivité du vide (ϵ_0) et la constante diélectrique du milieu (ϵ) et est limitée à une distance prédéfinie (r_{cutoff}).

Paramètres des simulations. Les molécules d'eau sont représentées de manière explicite en utilisant le modèle "single-point-charge" (SPC) préalablement utilisé dans des études similaires [Zhou, 2003, Settanni et Fersht, 2008].

Les structures natives obtenues par résonnance magnétique nucléaire du Trp-Cage (PDB : 1L2Y [Neidigh *et al.*, 2002]) et du TrpZip (PDB : 1LE0 [Cochran *et al.*, 2001]) ont été utilisées comme point de départ pour les simulations après avoir été optimisées afin de correspondre aux critères d'utilisation du champ de force unifié gromos96 53A6 (réduction du nombre d'atomes d'hydrogènes non-polaires sous forme de groupement méthyles [Feenstra *et al.*, 1999]). Bien que de nombreuses études théoriques impliquant le SDS aient déjà été réalisées (formation de micelles [Mackerell, 1995], interactions avec le solvant [Bruce *et al.*, 2002b] ou les ions [Bruce *et al.*, 2002a]), le nombre d'études atomistiques en dynamique moléculaire impliquant des protéines en présence du détergent reste limité [Bello *et al.*, 2012, Krishnamani et Lanyi, 2012, Tian *et al.*, 2012] et différents champs de force ont été utilisés. Les paramètres du SDS (charges partielles, longueurs de liaisons, angles et dièdres) ont dû être déterminé (Table 3.1) en suivant ces différentes étapes :

1. A partir de la structure du SDS (.pdb), la géométrie de la molécule a été optimisée par mécanique quantique (niveau B3LYP/6-31+G**).
2. Les charges partielles sur les différents atomes sont ensuite calculées et attribuées.
3. Les valeurs correspondant aux longueurs de liaison, angles et dièdres optimales sont extraites de la structure optimisée et associées aux constantes de forces telles que listées pour le champ de forces gromos96 53A6 [Oostenbrink *et al.*, 2004].

Pour tous les systèmes modélisés, la configuration initiale est optimisée par la méthode "steepest-descent" [Henkelman et Jónsson, 2000]. Toutes les simulations sont réalisées dans l'ensemble "isothermique-isobarique (NPT)" où le nombre de particules, la température et la pression sont des constantes. Ainsi, chaque groupe de calcul (peptide, détergent, eau, ions) est couplé à un thermostat (323K) et un barostat (1 bar) [Berendsen *et al.*, 1984] afin de s'approcher au maximum des conditions expérimentales. Les positions au sein des trajectoires atomiques (100 ns) sont calculées toutes les 2 fs. L'analyse des résultats est réalisée à l'aide des outils implémentés dans GROMACS. VMD [Humphrey *et al.*, 1996] et PyMol (DeLano Scientific, San Carlos, CA) sont utilisés pour la visualisation.

Simulations préliminaires. Afin de supporter l'utilisation du champ de forces gromos96 53A6 pour représenter notre système, des simulations préliminaires (100 ns) ont été réalisées afin de s'assurer (i) qu'en solution, les peptides (Trpcage et Trpzip) conservent leurs structures natives au cours des simulations (pas de perte de structure, même partielle) comme montré expérimentalement [Neidigh *et al.*, 2002, Cochran *et al.*, 2001], et (ii) qu'il est possible d'obtenir une structure dépliée des peptides (par exemple en chauffant les échantillons tel que démontré expérimentalement [Streicher et Makhatadze, 2007, Huang *et al.*, 2009]). Dans un premier temps, les peptides natifs ont été placés dans une boîte de simulation contenant les molécules d'eau (Figure 3.4 A) et des simulations (100 ns) ont permis de montrer que les peptides conservaient leurs structures natives au cours du temps (Figure 3.4 B). Le champ de force gro-

Table 3.1 – Paramètres du SDS optimisés pour le champ de forces gormos96 53A6.

Charges partielles						
i	$q(e)$		i	$q(e)$		
OM'	-0.601		C5H ₂	+0.029		
OM	-0.618		C6H ₂	-0.071		
S	+1.105		C7H ₂	+0.018		
OA	-0.471		C8H ₂	+0.054		
C1H ₂	+0.245		C9H ₂	-0.085		
C2H ₂	+0.039		C10H ₂	+0.006		
C3H ₂	-0.092		C11H ₂	+0.131		
C4H ₂	+0.041		C12H ₂	-0.112		
Longueurs de liaisons						
i	j		b_0 (nm)	k_b (10^6 kJ mol ⁻¹ nm ⁻⁴)		
OM'	S		0.146	8.04		
OM	S		0.147	8.04		
S	OA		0.170	8.37		
OA	CHn		0.142	8.18		
CHn	CHn		0.152	7.15		
Angles						
i	j	k	θ_0 (deg.)	k_θ (kJ mol ⁻¹)		
OM'	S	OM	114.0	780		
OM	S	OM	115.6	780		
OM'	S	OA	100.6	1320		
OM	S	OA	104.3	1320		
S	OA	CHn	114.4	530		
OA	CHn	CHn	108.2	530		
CHn	CHn	CHn	113.8	530		
Dihèdres						
i	j	k	l	Φ_0 (deg.)	k_Φ (kJ mol ⁻¹)	m
OM'	S	OA	CHn	180.0	2.93	3
OM	S	OA	CHn	59.9	2.93	3
S	OA	CHn	CHn	180.0	1.26	3
OA	CHn	CHn	CHn	180.0	2.67	1
CHn	CHn	CHn	CHn	180.0	5.92	3

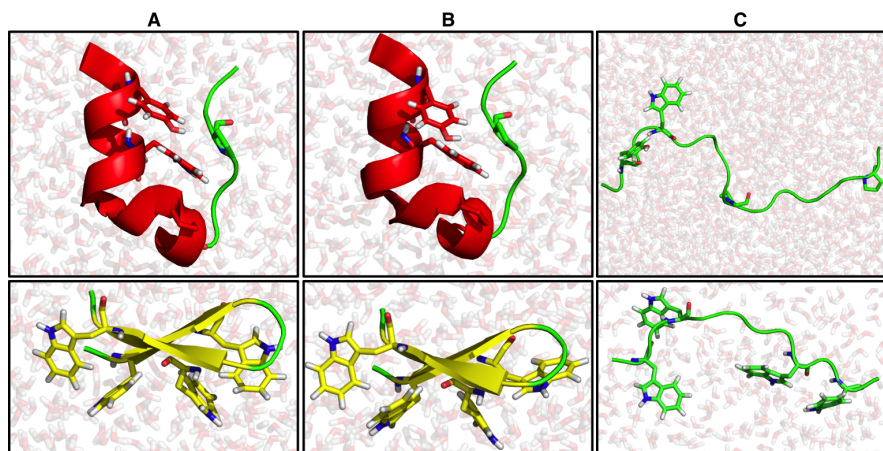


Figure 3.4 – Simulations préliminaires impliquant le champ de forces gromos96 53A6 et les peptides solubles Trpcage (haut) et Trpzp (bas). Les structures natives des peptides obtenues expérimentalement par RMN ([Neidigh *et al.*, 2002, Cochran *et al.*, 2001]) ont été optimisées pour l'utilisation du champ de forces unifié et insérées dans des boîtes de simulation contenant le solvant (A). Des simulations (100 ns) à température ambiantes (B ou à 100°C C) montrent que les peptides conservent ou perdent leurs structures respectivement, validant l'utilisation du champ de forces gromos96 53A6.

mos96 53A6 est donc capable de maintenir la structure des peptides en solution. Dans un second temps, des simulations (100 ns) à haute température (100°C) ont permis de montrer que les deux peptides perdent leurs structures natives respectives et sont complètement dénaturés (Figure 3.4 C). Ces résultats théoriques sont en accord avec ceux obtenus expérimentalement [Streicher et Makhatadze, 2007, Huang *et al.*, 2009] et théoriquement (impliquant d'autres champ de forces [Day *et al.*, 2010, Seshasayee, 2005, Settanni et Fersht, 2008]. Ces simulations préliminaires indiquent donc que le champ de forces gromos96 53A6 semble donc être adapté à l'étude de notre système.

3.4 Résultats

3.4.1 Trois régions de dénaturation

La dénaturation des peptides va être étudiée sur une large gamme de concentrations en détergent (0.1 à 100 mM) couvrant les régions en-dessous et au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC \approx 8 mM dans de l'eau milli-Q [Hayashi et Ikeda, 1980]). La CMC pouvant être modifiée en fonction du tampon et de la présence ou non de protéines [Hayashi et Ikeda, 1980, Chen *et al.*, 1986, Mattice *et al.*, 1976], des mesures de diffusion lumineuse dynamique (DLD) ont été réalisées afin de déterminer la CMC dans nos conditions

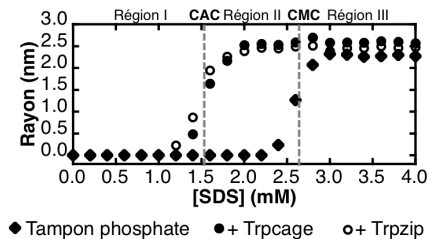


Figure 3.5 – Détermination de la concentration micellaire critique (CMC) par diffusion lumineuse dynamique du SDS en absence (◆) ou en présence du peptide Trpcage (○) ou Trpzip (●). L’augmentation de la taille des particules en suspension correspond à la formation de micelles.

expérimentales. De plus, en connaissant la CMC, il sera possible de déterminer les régions où les peptides interagiront avec le détergent sous sa forme monomérique ou micellaire (Figure 3.5). En absence de peptide (◆), la taille des particules augmente soudainement indiquant la formation de micelles. La valeur de la CMC dans nos conditions expérimentales a ainsi pu être déterminée à une concentration en SDS d’environ 2.6 mM (représentée par une ligne discontinue), telle que précédemment reportée dans le tampon phosphate (20 mM, pH = 7.4) [Hayashi et Ikeda, 1980, Chen *et al.*, 1986, Domínguez, 2011]. En présence du peptide Trpcage (○) ou Trpzip (●), l’agrégation du détergent autour du peptide est observée à une concentration de 1.6 mM (Figure 3.5), formant une structure “micellaire” [Otzen *et al.*, 2008, Andersen *et al.*, 2009]. Cette région est définie comme la concentration d’agrégation critique (CAC).

Puisqu’il a été démontré que les protéines interagissent différemment avec la forme monomérique ou micellaire du SDS [Andersen *et al.*, 2009, Bhuyan, 2010, Naidu et Prabhu, 2011, Turro et Lei, 1995], trois régions ont été définies en fonction de la concentration en détergent : (i) Une région en-dessous de la CAC (0.1 à 1.5 mM SDS) où le SDS existe uniquement sous une forme monomérique interagissant avec la protéine (schématisé à la figure 3.6 A) ; (ii) La région entre la CAC et la CMC (1.6 - 2.5 mM) où le détergent monomérique en solution est en concentration suffisante pour s’agréger autour de la chaîne polypeptidique menant à une structure micellaire exclusivement autour des peptides (B) ; (iii) La région au-dessus de la CMC (2.6 mM et plus) où le SDS s’auto-assemble en solution pour former des micelles qui interagiront avec le peptide (C).

3.4.2 Dénaturation du peptide TrpCage

Dans l’objectif de caractériser expérimentalement la structure générale des peptides en présence de SDS, des mesures spectroscopiques ont été réalisées (Figure 3.7). La fluorescence intrinsèque a été utilisée afin de suivre les changements au niveau de la structure tertiaire, tandis que le contenu en structures secondaires a quant à lui été suivi par des mesures de DC. En effet, le peptide possède une hélice α qui aura une signature particulière en DC. Afin d’obtenir des informations sur le système à une échelle atomique, des simulations

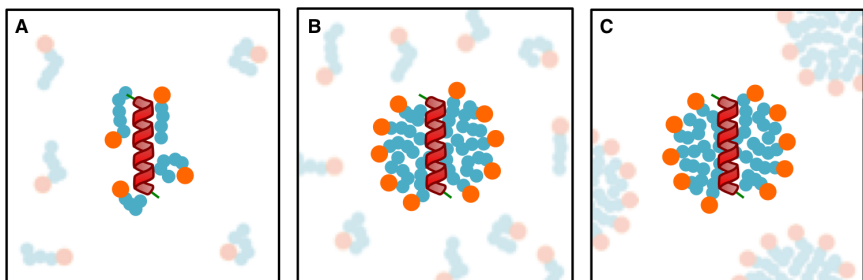


Figure 3.6 – Schématisation des trois types d’interactions ”SDS-Protéine” : (A) Région I : En dessous de la CAC, (B) Région II : entre la CAC et la CMC, et (C), Région III : au dessus de la CMC

(DM) ont été réalisées impliquant les peptides et le détergent sous sa forme monomérique ou micellaire.

Région I : En dessous de la CAC (0.1 - 1.5 mM). A très faibles concentrations en SDS (0.2 à 0.6 mM), un changement dans la fluorescence du tryptophane est observé (Figure 3.7 A, encart). En effet, la longueur d’onde correspondant au pic d’émission de fluorescence maximale (λ_{\max}) passe de 350 ± 1 nm pour l’échantillon natif (courbe noire) à 337 ± 2 nm en présence de SDS (1 mM, trait gris). Ce déplacement hypsochrome de 13 nm indique le passage du résidu tryptophane vers un milieu moins polaire [Eftink, 1994, Reshetnyak *et al.*, 2001] probablement suite aux interactions hydrophobes avec la queue alkyle du détergent. Ce changement d’environnement est envisageable si le résidu aromatique n’est plus “encagé”, indiquant donc la perte de la structure tertiaire. Dans le tampon phosphate, le peptide natif présente un signal DC typique d’une structure en hélice α avec deux minima à 222 et 208 nm et un maximum à 195 nm (Figure 3.7 B, encart, courbe noire). En présence de SDS (1 mM; courbe grise), un spectre différent est obtenu avec un seul minimum à 200 nm. En suivant l’ellipticité à 222 nm (où le changement est le plus important), la perte de la structure secondaire est observée sur la même gamme de concentrations en SDS que la perte de structure tertiaire (0.1 - 0.8 mM), suggérant un mécanisme de dénaturation en deux états (on passe de l’échantillon natif à l’échantillon dénaturé sans intermédiaire) tel que précédemment mentionné [Seshasayee, 2005, Heyda *et al.*, 2011]. A très faible concentration (0.8 mM, bien en dessous de la CAC), le SDS sous la forme monomérique est donc capable de déstabiliser la structure tertiaire et secondaire du peptide, menant à une structure complètement dénaturée.

Afin de simuler la dénaturation du peptide en présence du détergent sous la forme monomérique, une boîte contenant le Trpcage et seulement 6 molécules de SDS a été construite et des simulations (100 ns) ont été réalisées. Dans un premier temps, afin de quantifier les interactions entre le détergent et le peptide, le nombre d’atomes de SDS se trouvant à une distance inférieure ou égale à 3.5 Å de la surface de van der Waals du peptide a été calculé (Figure

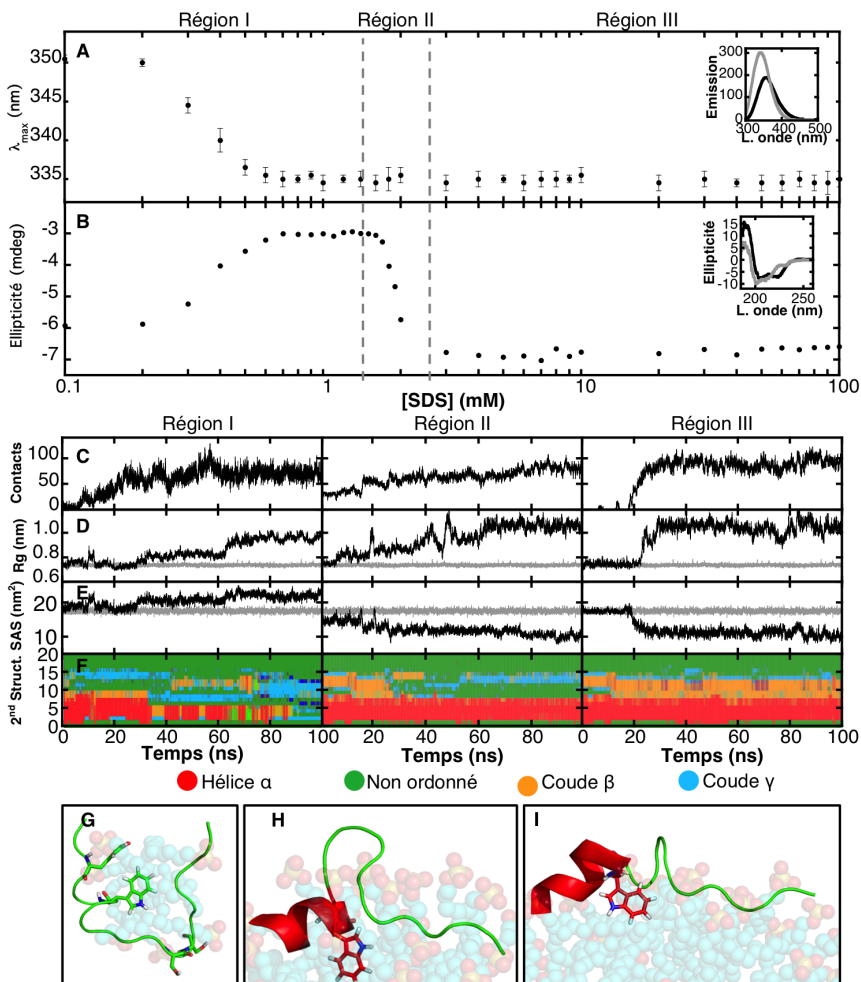


Figure 3.7 – Dénaturation expérimentale (A et B) et théorique (C - I) du peptide Trpcage. (A) Suivi de la stabilité de la structure tertiaire par FI. La longueur d'onde correspondant à l'intensité maximale d'émission est reportée en fonction de la concentration en SDS. L'encart correspondant à la situation native (noir) ou en présence de 1 mM SDS (gris). (B) Suivi de la stabilité de la structure secondaire par DC. L'ellipticité à 222 nm est reportée en fonction de la concentration en SDS. L'encart correspond respectivement au spectre natif (noir) ou en présence de 1 mM SDS (gris). (C) Nombre de contacts atomiques calculés par DM entre les molécules de SDS et le peptide ($d < 3.5 \text{ \AA}$). (D) Variation du rayon de giration (R_g) et (E) évolution de la surface accessible au solvant (SAS) au cours des simulations impliquant le peptide natif (gris) ou en présence de SDS (noir). (F) Variation du contenu en structures secondaires au cours du temps. (G, H et I) Structures obtenues pour le Trpcage en fin de simulations des régions I, II et III, respectivement. Les molécules d'eau ne sont pas représentées pour faciliter la visualisation.

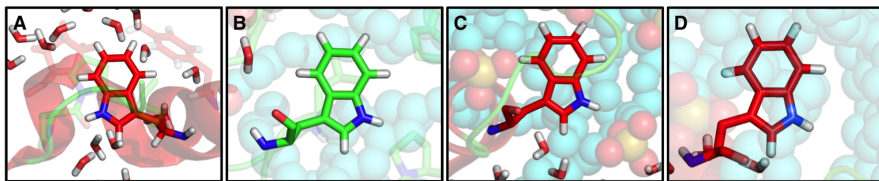


Figure 3.8 – Exposition du résidu Tryptophane (W6) au solvant dans la conformation (A) Native, (B) Région I, (C) Région II, (D) Région III; tel qu’observé par dynamique moléculaire. Les molécules d’eau se trouvant à proximité du résidu W6 sont explicitement représentées.

3.7, Région I, C). Les valeurs obtenues correspondent à la moyenne des trois simulations indépendantes. Au cours des simulations, le nombre de contacts augmente jusqu’à atteindre une valeur de 72 ± 4 atomes lorsque les 6 molécules de SDS sont liées au peptide, indiquant qu’en moyenne 12 ± 1 des 17 atomes de la molécule de SDS sont en contact étroit avec le Trpcage. Le rayon de giration (R_g) d’une protéine permet d’estimer son volume (correspondant à son niveau de compaction, et donc sa structure tertiaire). Alors qu’en absence de détergent la valeur du R_g reste stable à 0.74 ± 0.02 nm (Région I, D, courbe grise), la présence de molécules de SDS induit une augmentation du R_g jusqu’à atteindre une valeur de 0.96 ± 0.03 nm (courbe noire) indiquant que le volume général du peptide s’accroît et expliquant sa dénaturation. Expérimentalement, cette perte de structure tertiaire s’accompagne d’un changement du λ_{\max} suite à l’enfouissement du résidu tryptophane dans un milieu moins polaire, probablement la conséquence des interactions avec les queues alkyles du SDS. Le modèle théorique semble donc indiquer que dans la conformation native, bien que protégé par certains résidus, le résidu W6 est partiellement exposé au solvant (Figure 3.8, A). Lors du processus de dénaturation, ce résidu interagit avec la partie hydrophobe des molécules de SDS et se retrouve intégralement recouvert, limitant fortement le nombre de molécules d’eau aux alentours de ce résidu tel qu’observé à la Figure 3.8 B et expliquant le déplacement de λ_{\max} observé expérimentalement. L’expansion de la chaîne peptidique s’accompagne d’une légère augmentation de la surface accessible au solvant (SAS) indiquant que les monomères de SDS ne sont pas capables de couvrir intégralement les parties nouvellement exposées suite au dépliement du peptide (Figure 3.7, Région I, E). Finalement, il est possible de suivre le contenu en structures secondaires au cours des simulations (Figure 3.7, Région I, F). On observe ainsi que l’hélice α (rouge) disparaît au profit d’une structure non-ordonnée (vert) en fin de simulation, comme observé expérimentalement en DC.

Les observations expérimentales et théoriques s’accordent donc sur la perte des structures tertiaires et secondaires menant à la dénaturation complète du peptide Trpcage en présence de SDS (Figure 3.7 G). Les propriétés dénaturantes du SDS monomériques ont été mises en évidence dans plusieurs études impliquant la dénaturation de protéines solubles [Andersen *et al.*, 2009, Bhuyan, 2010, Jalili et Akhavan, 2011, Domínguez, 2011, Naidu et Prabhu, 2011, Bello

et al., 2012].

Région III : Au dessus de la CMC (2.6 mM et plus). Cette région est caractérisée par la présence de micelles qui interagissent directement avec le peptide. A partir des simulations (100 ns) faisant intervenir le peptide et une micelle préformée contenant 60 molécules de SDS, il est possible de déterminer le moment auquel les deux intervenants se rencontrent. En effet, le nombre de contacts atomiques augmente brusquement après environ 20 ns de simulation jusqu'à atteindre une valeur de 85 ± 9 (Figure 3.7, Région III, C). Les simulations montrent qu'en moyenne 18 ± 2 molécules de SDS de la micelle sont en contact avec le peptide ($d < 3.5$ Å). Puisqu'il est possible de calculer à partir des simulations qu'environ 5 ± 1 des 17 atomes du SDS interagissent étroitement avec le peptide, on peut en déduire que le nombre de contacts entre le peptide et les molécules de détergent (12 ± 1) est plus faible que le résultat obtenu en présence du détergent sous la forme monomérique (12 ± 1), indiquant que le SDS sous la forme micellaire interagit de manière moins étroite avec le peptide que sous sa forme monomérique. En effet, alors que l'ensemble des queues hydrophobes des molécules de détergent sont rassemblées au sein de la micelle dans le but de minimiser les interactions avec le solvant, la queue apolaire d'une molécule de SDS isolée est intégralement exposée aux molécules d'eau. Dans ce cas, les interactions peptide-détergent sont maximisées afin de réduire les interactions avec le solvant, expliquant la différence de valeurs de contacts atomiques.

L'utilisation de la fluorescence nous montre que, comme observé sur la région I, le résidu tryptophane est localisé dans un environnement moins polaire que dans la situation native puisque la valeur du λ_{\max} passe de 350 ± 1 à 336 ± 2 en présence de micelle (Figure 3.7 A). Les simulations montrent que lorsque le peptide interagit avec la micelle (aux alentours de 20 ns), le R_g augmente presque instantanément jusqu'à atteindre une valeur de 1.06 ± 0.12 nm indiquant la perte de structure tertiaire (Figure 3.7, Région III, D). Libéré de sa cage, le résidu W6 se retrouve enfoui dans la partie hydrophobe de la micelle afin de minimiser les interactions avec les molécules d'eau (Figure 3.8 D) expliquant le changement de λ_{\max} observé expérimentalement. L'interaction avec la micelle se caractérise par une diminution de la SAS (Figure 3.7, Région III, E) qui passe de 17.5 ± 0.5 pour le peptide natif (gris) à 10.1 ± 0.8 nm² lorsque le peptide interagit avec la micelle (noir) indiquant que presque la moitié (42 ± 4 %) de la surface du peptide est couverte par le SDS, l'autre étant exposée au solvant. De manière surprenante, alors que le peptide perdait sa structure secondaire en présence de monomères de SDS, l'interaction avec la micelle ne déstabilise pas l'hélice α . Les mesures de DC (Figure 3.7 B) montrent en effet que l'ellipticité en présence de micelles (-6.8 ± 0.2 mdeg) est proche des valeurs obtenues pour l'échantillon natif (-6.0 ± 0.1 mdeg), en accord avec les simulations où la structure en hélice α (rouge) se maintient tout au long de la simulation (Figure 3.7, Région III, F). Bien que le mécanisme de dépliage des protéines par le SDS ne soit pas encore compris, il a été montré que les structures en hélices α sont souvent stables dans ce détergent [Barrera *et al.*,

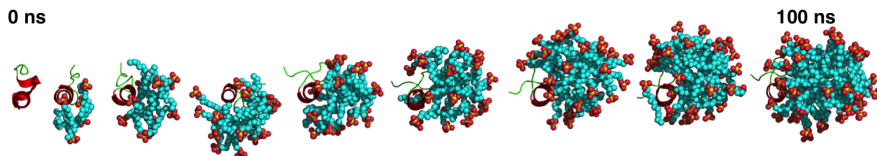


Figure 3.9 – Illustration de différentes étapes menant à la formation d’une micelle de SDS (60 molécules) autour du peptide Trpcage obtenue par DM.

2005, Patil *et al.*, 2009, Tulumello et Deber, 2009, Bello *et al.*, 2012] et que le SDS est même capable d’induire des hélices α non natives dans certaines conditions [Chamani *et al.*, 2006, Patil *et al.*, 2009, Bhuyan, 2010, Domínguez, 2011, Naidu et Prabhu, 2011, Bello *et al.*, 2012], expliquant pourquoi l’hélice α du Trpcage reste stable en présence de la micelle.

En résumé, lorsque le peptide entre en contact avec la micelle, il est partiellement dénaturé et perd sa structure tertiaire tout en conservant son hélice α (Figure 3.7 I). Il est intéressant de noter qu’au cours des simulations, le peptide reste à l’interface entre la région hydrophobe (queues hydrocarbonées) et la région hydrophile (têtes polaires) de la micelle.

Région II : Entre la CAC et la CMC (1.5 - 2.5 mM). Sur cette gamme de concentrations, le SDS forme des micelles exclusivement autour du peptide tel que démontré par les mesures DLD. Idéalement, ce système devrait être modélisé par une boîte contenant 60 molécules de SDS (la quantité nécessaire pour former la micelle) en solution. Afin de reproduire une concentration effective inférieure à la CMC (pour éviter que le SDS s’auto-assemble en micelle plutôt que de former la micelle au niveau du peptide), les dimensions des boîtes de simulation devraient être augmentées pour permettre ainsi d’y insérer de nombreuses molécules d’eau. Toutefois, des limitations dues aux ressources calculatoires rendent ce genre de système impossible à modéliser. Afin de représenter ce système complexe, une solution alternative a donc été choisie : les simulations commencent par une boîte contenant le peptide et 6 molécules de SDS réparties aléatoirement en solution. Toutes les 5 ns, la simulation est arrêtée afin de comptabiliser les molécules liées au peptide. Un nombre équivalent est alors rajouté aléatoirement dans le système et la simulation est relancée pour 5 autres ns. De cette manière, le nombre de molécules de SDS dans le système augmente régulièrement tout en conservant uniquement 6 monomères de SDS en solution. La formation de la micelle ne peut donc avoir lieu qu’autour du peptide, mimant ainsi la situation au niveau de la CAC (Figure 3.9).

De cette manière, on observe que le nombre de contacts atomiques entre le peptide et le détergent augmente de manière régulière au cours de la simulation jusqu’à atteindre une valeur de 79 ± 3 indiquant qu’en fin de simulation, lorsque la micelle est formée autour du peptide, environ 4 ± 1 des 17 atomes du SDS sont en contact avec le peptide. Ces résultats sont très proches de ceux

obtenus lorsque le peptide interagit directement avec la micelle. Les résultats de fluorescence intrinsèque montrent que le résidu tryptophane est enfoui dans une région apolaire ($\lambda_{\max} = 337 \pm 1$ nm) à toutes les concentrations en SDS (1.5 à 2.5 mM). Nous avons vu précédemment que quelle que soit la forme du SDS (monomérique ou micellaire), le détergent interagit fortement avec le résidu W6. Il est donc logique d’observer la même tendance sur une gamme de concentrations couvrant la formation des micelles. L’aggrégation du SDS autour du peptide est probablement au niveau de résidu W6 (Figure 3.8 C). Les simulations montrent que lors de la formation de la micelle autour du peptide, les valeurs obtenues pour le R_g (1.07 ± 0.06 nm) et pour la SAS (10.21 ± 0.08 nm²) correspondent parfaitement à celles obtenues lorsque le peptide interagit avec la micelle préformée. Au niveau de la structure secondaire, on observe qu’au niveau de la CAC (1.5 - 2.0 mM SDS), l’ellipticité passe de -3.0 ± 0.2 à -6.8 ± 0.2 mdeg liant très clairement le retour de l’hélice α avec la formation de la micelle autour du peptide. Ces observations suggèrent donc que le mécanisme de dépliage induit par la formation de la micelle autour du peptide est probablement identique à celui au-dessus de la CMC où le Trpcage rencontre directement une micelle. Au final, la structure partiellement dénaturée (perte de la structure tertiaire et maintien de sa structure secondaire) obtenue est très proche de celle obtenue à la région III (Figure 3.7 H).

3.4.3 Dénaturation du peptide TrpZip

Région I : En dessous de la CAC (0.1 - 1.5 mM). Les résidus tryptophanes du Trpzip (W2, W4, W9 et W11) étant complètement exposés au solvant dans la conformation native du peptide (Figure 3.3 B), un changement de λ_{\max} sera principalement le reflet de l’interaction de ces acides aminés avec le détergent. En effet, les résidus aromatiques peuvent être recouverts par les molécules de SDS (un déplacement du λ_{\max} sera observé) et éventuellement conserver leur orientation particulière (perpendiculaires les uns aux autres). Un déplacement du λ_{\max} (355 ± 1 à 335 ± 2 nm) à très faibles concentrations en SDS (0.3 - 0.6 mM) est observé (Figure 3.10, A) suggérant que, comme pour le peptide Trpcage, le détergent sous la forme monomérique se lie au peptide au niveau des résidus aromatiques. Le modèle théorique montre qu’en fin de simulation (100 ns), le nombre de contacts atomiques atteint la valeur de 26 ± 4 et que donc seuls 4 sur les 17 atomes du SDS interagissent avec le peptide (C). Cette valeur est très différente de celle obtenue pour le peptide Trpcage (12 ± 1 atomes), indiquant que le détergent est en contact avec le peptide de manière très localisée. La valeur du R_g ne varie pas (D, noir) et reste identique à celle en absence de SDS (D, gris) indiquant que le volume général du peptide ne change pas et que la structure tertiaire reste donc intacte. Suite aux interactions avec les molécules de détergent, la SAS du peptide diminue légèrement passant de 13.7 ± 0.3 nm² pour le peptide natif (E, gris) à 11.1 ± 0.2 nm². Il est possible de mettre en évidence l’organisation des résidus tryptophanes puisqu’ils sont à l’origine d’un signal DC très singulier (exciton) composé d’un pic positif à 228 nm et un pic négatif à 213 nm (B, encart, noir). Les mesures en DC à 228 nm montrent que les résidus tryptophanes ne sont pas affectés par la présence de

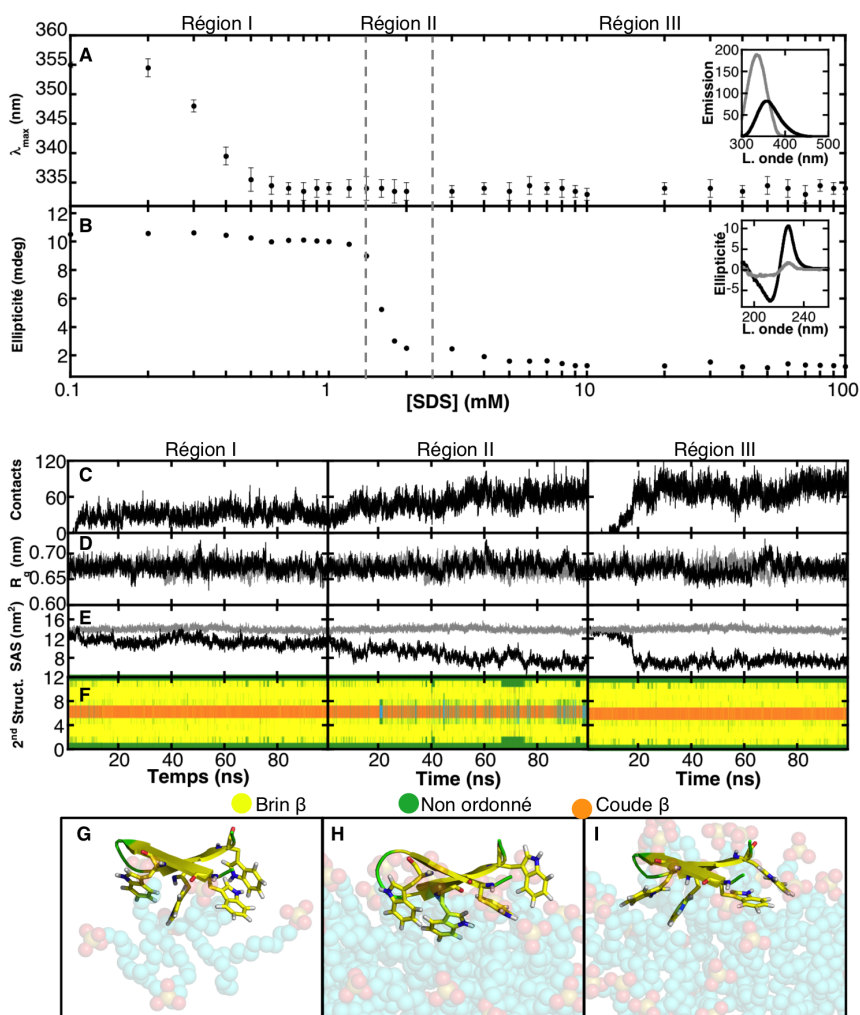


Figure 3.10 – Dénaturation expérimentale (A et B) et théorique (C - I) du peptide Trpzip. (A) Suivi de la stabilité de la structure tertiaire par FI. La longueur d'onde correspondant à l'intensité maximale d'émission est reportée en fonction de la concentration en SDS. L'encart correspondant à la situation native (noir) ou en présence de 1 mM SDS (gris). (B) Suivi de la stabilité de la structure secondaire par DC. L'ellipticité à 222 nm est reportée en fonction de la concentration en SDS. L'encart correspond respectivement au spectre natif (noir) ou en présence de 1 mM SDS (gris). (C) Nombre de contacts atomiques calculés par DM entre les molécules de SDS et le peptide ($d < 3.5 \text{ \AA}$). (D) Variation du rayon de giration (R_g) et (E) évolution de la surface accessible au solvant (SAS) au cours des simulations impliquant le peptide natif (gris) ou en présence de SDS (noir). (F) Variation du contenu en structures secondaires au cours du temps. (G, H et I) Structures obtenues pour le Trpzip en fin de simulations des régions I, II et III, respectivement. Les molécules d'eau ne sont pas représentées pour faciliter la visualisation.

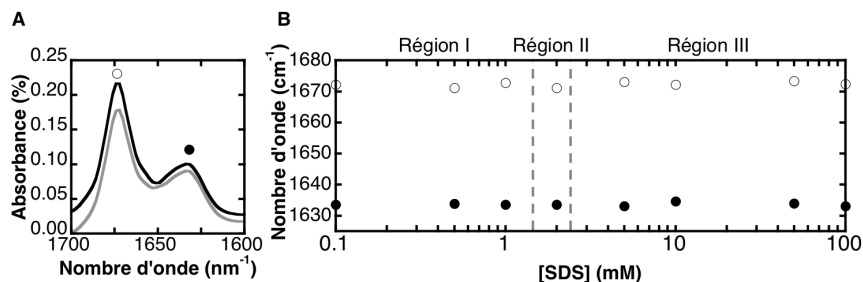


Figure 3.11 – Stabilité de la structure secondaire en épingle β du peptide Trpzip en présence de différentes concentrations en SDS observée par spectroscopie infrarouge. **(A)** Spectre FTIR dans la région amide I du peptide natif (gris) et en présence de 10 mM SDS (noir). **(B)** Positions des maxima observés sur le spectre FTIR en fonction de la concentration en SDS.

SDS en concentration inférieure à la CAC. Puisque le signal DC est pollué par le signal correspondant aux excitons (5 fois plus intense que le signal correspondant à la structure secondaire [Roy *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2009]), des mesures de spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisées dans la région amide I (1612 - 1690 cm^{-1}). Cette région correspond aux vibrations d'élongation des groupements carbonyles ($\text{C}=\text{O}$) du squelette polypeptidique impliqués dans les structures secondaires et toute variation dans cette gamme de fréquences pourra être attribuée à des changements structuraux [Grdadolnik, 2002, Kong et Yu, 2007]. En effet, la structure secondaire en feuillet β observée au sein du peptide Trpzip est stabilisée par des ponts hydrogènes entre les deux brins β antiparallèles faisant intervenir les groupements carbonyles d'un brin et le groupement amine de l'autre brin. En absence de SDS, le spectre FTIR du peptide montre deux pics à 1672 ± 1 et 1634 ± 1 cm^{-1} (Figure 3.11 A) correspondant à la fréquence de vibration des groupements carbonyles impliqués dans une structure, respectivement, en coude et en brin β , tel que précédemment observé pour ce peptide [Cochran *et al.*, 2001, Wu *et al.*, 2010]. Les fréquences correspondant à l'absorbance maximale des deux pics sont reportées en fonction de la concentration en détergent (B). En présence de SDS sous la forme monomérique (Région I), les fréquences de vibrations restent à des valeurs maximales stables indiquant que le peptide conserve sa structure en épingle β . Le modèle théorique supporte cette observation puisque la composition en structure secondaire reste constante tout au long de la simulation (Figure 3.10 F). Ainsi, bien que les monomères de SDS interagissent avec le peptide, celui-ci conserve sa structure native (G). De précédentes études ont montré que les structures en feuillet β sont plus résistantes à la dénaturation par le SDS que celles en hélices α [Manning et Colon, 2004, Nielsen *et al.*, 2007], expliquant pourquoi le peptide Trpzip conserve sa structure native en présence de ce détergent alors que le peptide Trpcage se retrouve complètement dénaturé à des concentrations équivalentes.

Région III : Au dessus de la CMC (2.6 mM et plus). Le nombre de contacts atomiques entre le détergent et le peptide augmente brusquement aux alentours de 10 ns (Figure 3.10, Région III, **C**), indiquant l'interaction entre les deux partenaires, et atteint la valeur de 71 ± 5 en fin de simulation, correspondant à 6 ± 1 atomes par molécule de SDS (12 à moins de 3.5 Å du peptide). Comme observé en dessous de la CAC, les résidus tryptophanes sont localisés dans un environnement apolaire, probablement l'intérieur hydrophobe de la micelle, puisque la λ_{\max} est de 335 ± 2 nm sur toute cette gamme de concentration (**A**). La SAS diminue, passant de 13.7 ± 0.3 à 7.7 ± 0.7 nm² en fin de simulation (**E**), ce qui indique que, comme pour le Trpcage, près de la moitié de la surface du peptide ($43.8 \pm 2.4\%$) est recouverte par la micelle. Malgré la présence du détergent, le peptide reste dans une conformation proche de la structure native. En effet, la valeur du R_g (0.67 ± 0.01 nm) reste équivalente à celle de l'échantillon natif (**D**) indiquant que le maintien de la structure tertiaire. De plus, le contenu en structure secondaire ne varie pas tel qu'observé théoriquement par la stabilité des brins β au cours des simulations (**F**) et expérimentalement où les fréquences correspondant aux absorbances maximales ne varient pas (Figure 3.11, Région III). Bien que la structure en épingle β soit maintenue tout au long des simulations (Figure 3.10 **I**), la présence de la micelle affecte l'organisation particulière des résidus tryptophanes formant les excitons. En effet, les mesures en DC montrent qu'en présence de concentrations en SDS supérieures à la CMC, l'ellipticité à 229 nm est de seulement 1.41 ± 0.19 mdeg (Figure 3.10, encart, gris). Cette faible valeur a déjà été reportée lorsque le peptide est dénaturé par la chaleur [Huang *et al.*, 2009] et avait été attribuée à la perte des excitons. A partir des simulations, il est possible de calculer l'angle entre les différents résidus tryptophanes (Figure 3.12). Alors qu'en présence du SDS sous la forme monomérique (**A**), les angles (Ω et Δ) formés par les résidus W4W9 et W2W11 (formant les excitons) restent à des valeurs constantes (trait noir) proches de celles obtenues en absence de SDS (trait gris), la présence d'une micelle (**B**) interfère avec l'organisation des résidus tryptophanes et les angles Ω et Δ observés varient fortement, expliquant la perte de signal DC à 228 nm.

La présence de la micelle n'affecte donc pas la structure secondaire (épingle β) du peptide, mais a un effet sur sa structure tertiaire (imbrication des résidus tryptophanes). Le peptide se retrouve donc dans une conformation partiellement dépliée en surface de la micelle (Figure 3.10 **I**).

Région II : Entre la CAC et la CMC (1.6 - 2.5 mM). Comme précédemment, afin de modéliser la formation de la micelle autour du peptide, les simulations commencent dans une boîte contenant le peptide et 6 molécules de SDS en solution. Régulièrement, des molécules de SDS sont rajoutées dans le système afin de mimer cette région particulière où la micelle n'est expérimentalement observée qu'autour du peptide (Figure 3.13).

Les mesures en fluorescence intrinsèque montrent que les résidus tryptophanes sont localisés dans un environnement apolaire puisque la λ_{\max} est de 335 ± 2 nm. Il est logique d'imaginer que l'aggrégation du détergent sur le peptide se fait donc au niveau de ces résidus. La formation de la micelle s'accom-

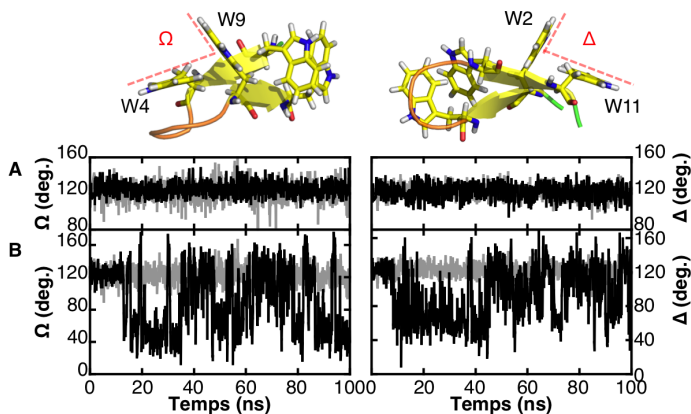


Figure 3.12 – Stabilité des angles formés par les différents résidus tryptophanes (W4W9, Ω et W2W11, Δ) obtenue à partir des simulations MD du peptide en absence (gris) ou en présence du SDS (noir) sous sa forme monomérique (A) ou micellaire (B).

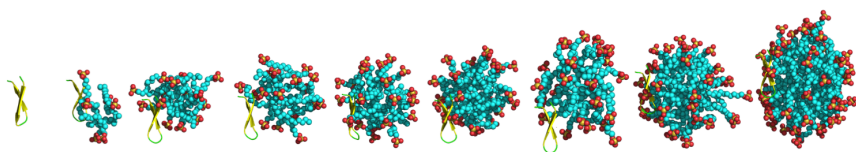


Figure 3.13 – Formation d’une micelle de SDS autour du peptide Trpzip.

pagne d'une baisse de l'ellipticité à 228 nm (Figure 3.10 **B**) passant de 10.6 ± 0.3 à 1.8 ± 0.1 mdeg. Comme observé au dessus de la CMC (Région III), la micelle nouvellement formée au niveau des résidus tryptophanes affecte leur arrangement particulier, menant à la perte du signal DC des excitons. Les simulations montrent que le nombre de contacts atomiques (67 ± 4 ; **C**), le R_g (0.66 ± 0.01 nm; **D**) et la SAS (6.85 ± 0.71 nm²; **E**) atteignent des valeurs proches de celles obtenues lorsque le peptide interagit avec la micelle préformée, suggérant les mêmes mécanismes de dénaturation partielle. Enfin, la formation d'une micelle directement sur le squelette polypeptidique n'affecte pas la structure secondaire du peptide tel que montré théoriquement puisque les brins β restent stables tout au long des simulations (**F**) et expérimentalement (Figure 3.11) où l'on n'observe pas de changement de fréquence de vibrations. Le peptide conserve donc sa structure native en épingle β (Figure 3.10, **H**).

Résumé. L'effet dénaturant du détergent a été mis en évidence sur une large gamme de concentrations permettant d'étudier la stabilité de peptides en présence de monomères ou de micelles de SDS. Nous avons ainsi montré que la capacité du détergent à induire le dépliement est différente en fonction (i) de la séquence du peptide (et donc de sa structure secondaire) puisque le Trpcage est partiellement ou complètement dénaturé par le SDS alors que le Trpzip conserve globalement sa structure; (ii) et de la concentration en détergent. En effet, sous sa forme monomérique ou micellaire, le SDS a un effet différent sur les structures secondaires, suggérant un type d'interaction différent. Sous la forme monomérique, le détergent semble se lier de manière plus étroite et spécifique avec le peptide que sous la forme micellaire. Dans les deux cas, les tryptophanes constituent un site d'interaction privilégié et la micelle induit la perte de structure tertiaire. Pour finir, les deux peptides restent en surface de la micelle, à l'interface entre un milieu polaire (solvant et groupements sulfates) et l'intérieur de la micelle hydrophobe, comme précédemment observé pour d'autres peptides solubles [Jalili et Akhavan, 2011, Tian *et al.*, 2012]. En effet, l'intérieur de la micelle étant hydrophobe, il est logique de retrouver ces peptides en surface.

3.4.4 Interactions SDS-peptide

Les modèles théoriques étant en parfaite adéquation avec les données expérimentales, ils peuvent être utilisés afin d'étudier l'interaction entre le détergent et les peptides à un niveau atomique et de proposer des mécanismes de dépliement.

Le Trpcage. Le nombre de contacts atomiques entre le détergent et chacun des résidus des deux peptides a été calculé ($d < 3.5 \text{ \AA}$) et représenté en fonction du temps de simulation à la Figure 3.14. En dessous de la CMC (**A**), le premier contact avec le SDS est réalisé au niveau de deux résidus polaires (S13 et S14), ce qui suggère une interaction avec la tête polaire du détergent (Figure 3.15, **A**), en adéquation avec de précédentes études ayant mis en évidence le rôle clé des résidus polaires dans l'interaction avec le détergent [Bhuyan, 2010, Hu *et al.*, 2011]. Ensuite, les molécules de SDS semblent s'agréger au niveau de l'hélice

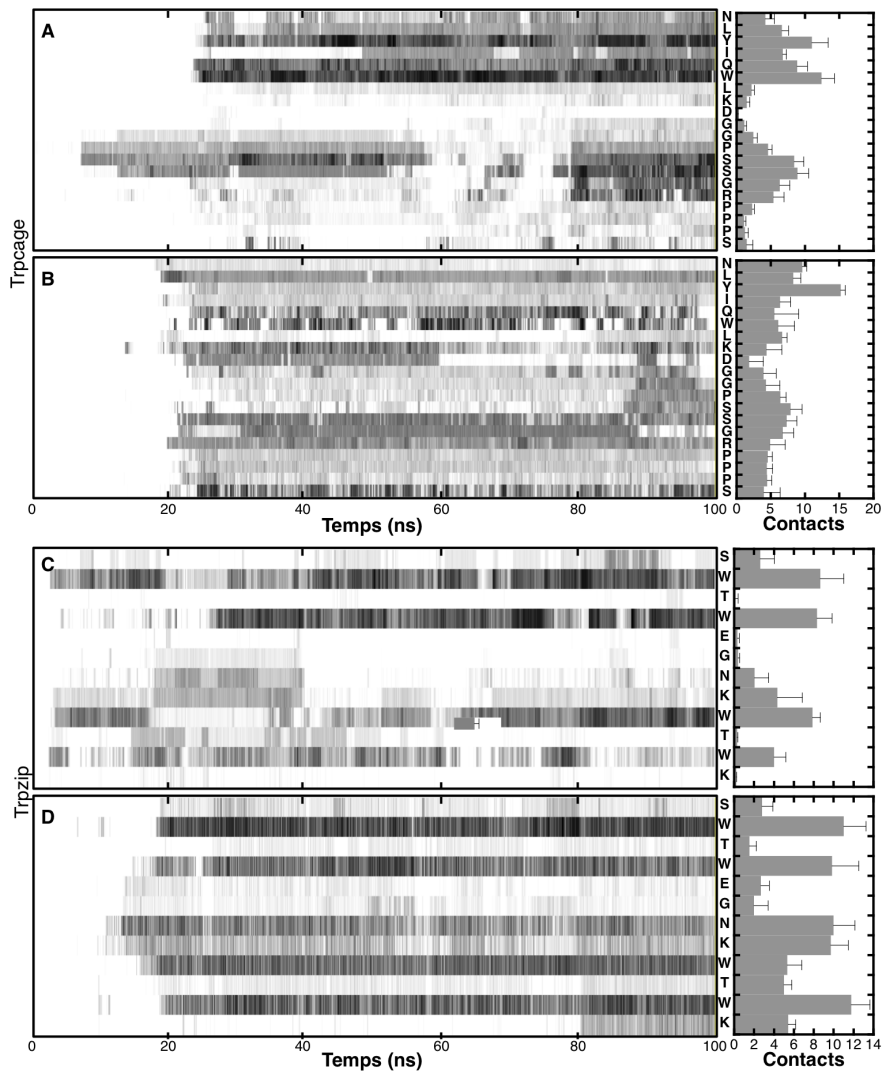


Figure 3.14 – Spécificité des interactions “détergent-peptide” en dessous (A et C) et au-dessus (B et D) de la CMC obtenue à partir des simulations MD. Le nombre d’atomes de SDS proches ($d < 3.5 \text{ \AA}$) de chaque résidu a été reporté en fonction du temps de simulation en utilisant une échelle allant du blanc (minimum) au noir (maximum) (gauche), et en calculant la moyenne des interactions par résidu sur les 10 dernières nanosecondes de simulations (droite).

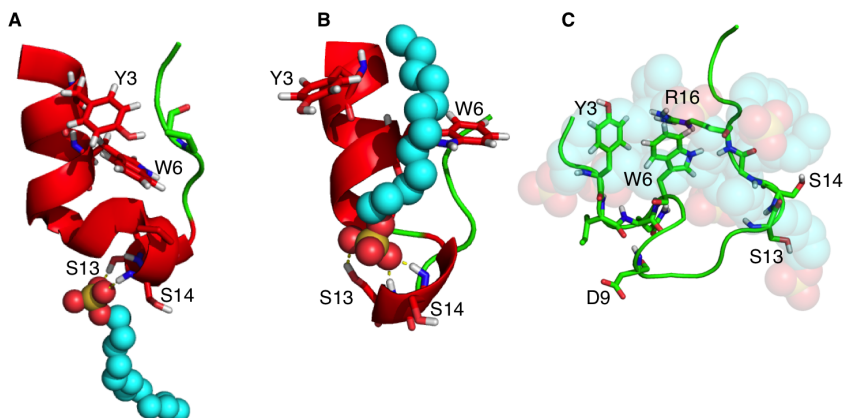


Figure 3.15 – Interactions entre le peptide Trpcage et le SDS sous sa forme monomérique identifiée par simulations MD. (A) Premier contact entre le détergent et le peptide au niveau des résidus polaires. (B) Réarrangement de la queue hydrophobe au niveau de la région hydrophobe du peptide. (C) Situation obtenue en fin de simulation (100 ns) où les 6 molécules de SDS sont en contact avec le peptide dénaturé.

α , en favorisant les interactions avec les résidus aromatiques. En calculant la moyenne des interactions avec le peptide sur les 10 dernières nanosecondes (Figure 3.14, A, partie de droite), il est possible d'identifier les zones d'interactions favorables. Ainsi, en fin de simulation, le SDS s'est agrégé autour de deux régions particulières séparées par un résidu chargé négativement (D9) : l'extrémité N-terminale du peptide où l'on trouve de nombreux résidus hydrophobes et la région contenant deux résidus polaires (S13 et S14) et un chargé positivement (R16) (Figure 3.15, C). Au dessus de la CMC (Figure 3.14, B), les contacts semblent moins spécifiques et la distribution est répartie sur l'ensemble de la séquence (partie de droite). Le peptide est inséré à l'interface des têtes polaires et des queues hydrophobes (Figure 3.16, A). De manière intéressante, on observe qu'au niveau de l'hélice α , les résidus aliphatiques et aromatiques sont insérés au sein de la région contenant les queues hydrocarbonées alors que les résidus polaires et chargés pointent vers le solvant et les têtes polaires du SDS (B) expliquant la stabilité de cette structure en présence d'une micelle.

Le Trpzip. Les contacts atomiques entre le détergent monomérique et le peptide sont majoritairement localisés au niveau des résidus tryptophanes exposés au solvant (Figure 3.14, C). Le premier contact n'est donc plus dirigé par la tête polaire du détergent mais bien par sa partie apolaire (Figure 3.17, A), en accord avec le modèle où la queue alkyle du détergent est également capable de se lier à la surface de protéines [Andersen *et al.*, 2009, Bhuyan, 2010, Hu *et al.*, 2011]. En fin de simulation, les molécules de SDS se sont agrégées autour des résidus tryptophanes réduisant leur exposition au solvant (Figure 3.17 B). En présence de la micelle qui expose uniquement une surface chargée négativement

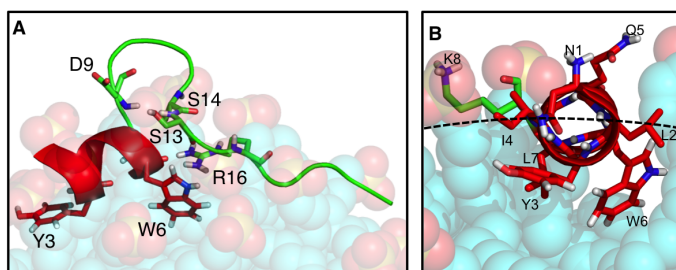


Figure 3.16 – Mise en évidence par simulations DM des interactions entre le peptide Trpcage et la micelle de SDS. (A) Localisation du peptide à l’interface entre le milieu polaire (solvant et groupements sulfates) et apolaire (queues hydrocarbonnées). (B) Stabilité de l’hélice α . Les résidus apolaires sont localisés au sein du noyau hydrophobe de la micelle tandis que les résidus polaires pointent vers le solvant ou les groupements sulfates polaires du SDS.

au solvant, le premier contact est réalisé avec la lysine chargée positivement (K8, Figure 3.14, D). Le peptide est également localisé à l’interface entre le milieu polaire et apolaire de la micelle (Figure 3.17) réduisant la spécificité des interactions puisque la distribution est répartie sur plus de résidus (Figure 3.14, D, partie de droite). Les résidus aromatiques restent toutefois un lieu d’interaction privilégiés avec le détergent ancrant le peptide dans la micelle.

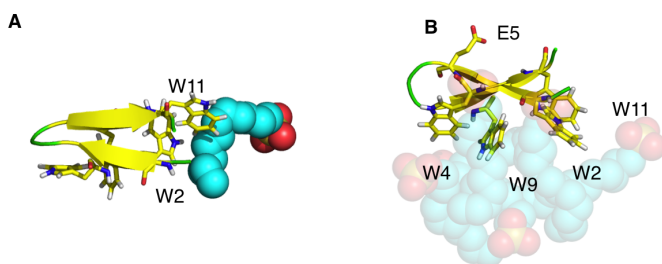


Figure 3.17 – Mise en évidence par simulations DM des interactions entre le peptide Trpzipeptide et le SDS sous sa forme monomérique. (A) Premiers contacts de nature hydrophobe. (B) Situation obtenue en fin de simulation (100 ns) où les 6 molécules de SDS interagissent avec le peptide au niveau des différents résidus tryptophanes.

Généralités. Quel que soit le peptide, les interactions entre le détergent et les peptides semblent plus spécifiques lorsque le SDS est sous la forme monomérique que micellaire. Le nombre de contacts correspondant à chaque résidu a été groupé en catégories afin de déterminer quels types d’acides aminés interagissent avec le détergent (Figure 3.18).

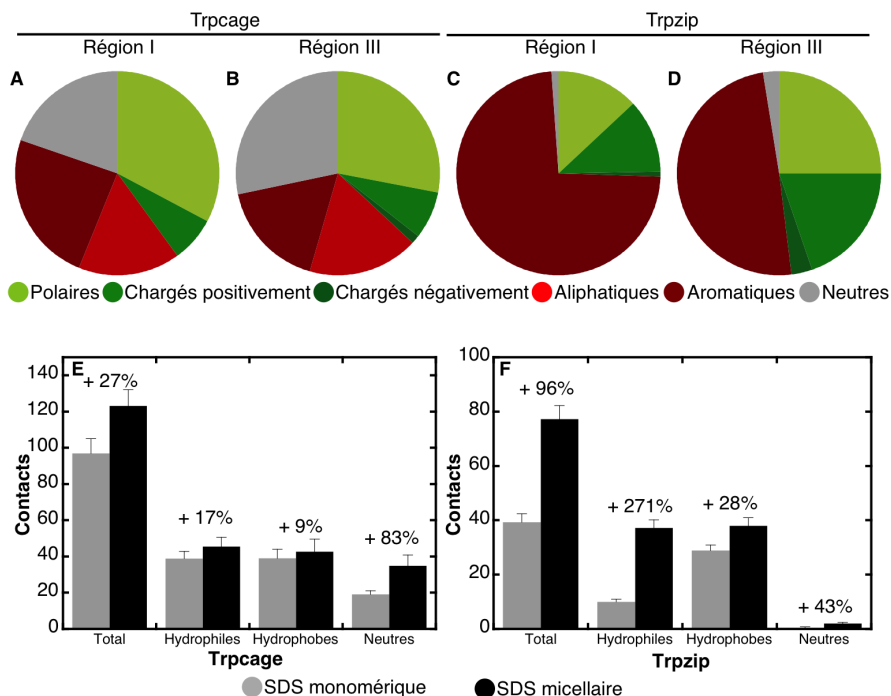


Figure 3.18 – Nature des contacts entre les molécules de SDS et les peptides Trpcage et Trpzp identifiées à partir des simulations de DM. (A-D) Catégories d'acides aminés en contacts ($d < 3.5\text{\AA}$) avec les molécules de détergent. (E-F) Changement d'exposition des différentes catégories d'acides aminés au détergent monomérique (gris) ou micellaire (noir).

On remarque ainsi que, pour le peptide Trpcage, 40.0 et 40.2 % des contacts avec les monomères de SDS (Figure 3.18, A) se font avec des résidus hydrophiles (polaires ou chargés) et hydrophobes (aliphatiques ou aromatiques). Lorsque le peptide interagit avec la micelle (B), ces chiffres diminuent légèrement pour atteindre respectivement 37.0 et 34.6 %. Le peptide étant ancré à la surface de la micelle, les acides aminés neutres sont plus exposés au SDS et il est donc logique de voir leur nombre de contacts augmenter. Une tendance différente s'observe avec le peptide Trpzp. Ainsi, seul un quart (25.5%) des interactions avec le SDS sous sa forme monomérique se font par des acides aminés hydrophiles, le reste (73.5%) étant réalisé avec les résidus hydrophobes (exclusivement les tryptophanes) comme mentionné précédemment (C). Lorsque le peptide interagit avec la micelle, ces chiffres varient fortement puisque près de la moitié (48.2%) des interactions est réalisée avec des résidus polaires et l'autre (49.2%) avec les acides aminés aromatiques (D). En réalité, le nombre des interactions avec les résidus hydrophobes ne diminue pas puisque ceux-ci sont insérés à l'intérieur des micelles comme précédemment observé (Figures 3.8 et 3.10, I). D'une manière générale, le nombre de contacts avec le détergent est plus élevé lorsque le peptide interagit avec la micelle qu'avec le SDS monomérique allant

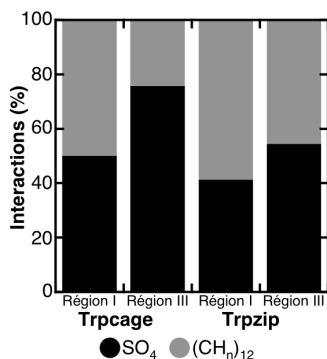


Figure 3.19 – Proportion des interactions coulombiennes (noir) ou quadrupolaires (gris) entre le peptide et le détergent.

d’une augmentation de +27% pour le Trpcage (Figure 3.18, **E**) à +96% pour le Trpzip (**F**). Cette augmentation est principalement due à une augmentation du nombre de contacts avec les résidus neutres (prolines et glycines) dans le cas du Trpcage ou avec les acides aminés hydrophiles dans le cas du Trpzip. Encore une fois, le comportement du SDS est différent en fonction de la séquence (et donc de la structure) du peptide.

Afin de déterminer quel type d’interaction (ionique/polaire ou hydrophobe) est majoritaire dans le processus de dépliement, ou leurs proportions respectives, le nombre de contact atomiques entre les peptides et la tête ou la queue du détergent a été calculé (Figure 3.19). Pour les deux peptides, les interactions avec le SDS en dessous de la CMC (Région I) sont réparties de manière équivalente entre le groupement sulfate du détergent et la chaîne alkyle. Lorsque le peptide se trouve à la surface de la micelle, le nombre de contacts avec la tête chargée est plus important qu’avec la queue hydrophobe pour les deux peptides. Les séquences de ces derniers contiennent plus de résidus hydrophiles/neutres que de résidus hydrophobes, expliquant cette tendance.

3.5 Conclusions

Deux peptides solubles ont été dénaturés expérimentalement et théoriquement sur une large gamme de concentrations en SDS. Trois régions ont ainsi été définies : (i) Une première région où le SDS existe exclusivement sous la forme monomérique. Le Trpcage est complètement dénaturé (perte des structures tertiaire et secondaire) tandis que le Trpzip reste dans une conformation native (les structures en feuillet β étant plus résistantes à la dénaturation par le SDS). Les molécules de détergent interagissent avec des régions spécifiques des peptides, bien que celles-ci soient différentes selon la séquence. Ainsi, pour le Trpcage, le détergent interagit avec une région riche en acides aminés hydrophobes et une autre riche en résidus polaires et chargés positivement ; alors que pour le peptide Trpzip, les interactions avec le détergent se font majoritairement au niveau des résidus hydrophobes exposés au solvant. (ii) Une région où le SDS

peut s'agréger autour du peptide formant une structure micellaire : la concentration d'agrégation critique (CAC). Les résidus aromatiques semblent jouer le rôle de point de nucléation du détergent autour de la chaîne polypeptidique et les deux peptides perdent leur structure tertiaire respective, mais conservent leur structure secondaire. (iii) La région au dessus de la CMC où le peptide rencontre une micelle préformée en solution. Cette micelle n'exposant qu'une surface polaire, l'interaction avec les peptides doit se faire par des résidus polaires ou chargés positivement dans un premier temps. Ensuite, les deux peptides se dénaturent partiellement (perte de la structure tertiaire et maintien de la structure secondaire) à l'interface entre le milieu polaire (groupements sulfates et solvant) et apolaires (chaînes hydrocarbonnées). La localisation du peptide impose de nombreux contacts entre les molécules de SDS et les différents acides aminés composant les peptides. Ainsi, les contacts avec le détergent sont moins spécifiques en présence de la micelle que lorsque le SDS existe sous la forme monomérique (Région I).

4.1 Introduction

Le sodium dodécyle sulfate (SDS) est un détergent anionique régulièrement utilisé dans les laboratoires de biochimie pour ses propriétés dénaturantes à des concentrations millimolaires [Bhuyan, 2010]. Alors que des concentrations en dessous de la concentration micellaire critique ($CMC \approx 8$ mM) sont suffisantes pour induire le dépliement de protéines solubles [Valstar *et al.*, 1999, Oellerich *et al.*, 2003, Nielsen *et al.*, 2005, Andersen *et al.*, 2009], des concentrations en détergent plus élevées (au dessus de la CMC) sont nécessaires pour dénaturer les protéines membranaires (de l'ordre de 50 à 70 mM) [Keller *et al.*, 2006, Tulumello et Deber, 2009, Veerappan *et al.*, 2011, Krishnamani *et al.*, 2012, Roussel *et al.*, 2013a]]. D'une manière générale toutes les protéines (solubles et membranaires) sont donc dénaturées dans cette gamme de concentration, bien au-dessus de la CMC, et le SDS n'existe que sous la forme de micelles. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que lorsque les peptides solubles sont en contact avec la micelle, les résidus aliphatiques et aromatiques interagissent avec l'intérieur hydrophobe de la micelle tandis que les résidus neutres, polaires et chargés se retrouvent en surface en contact avec les groupements sulfates du SDS. Dans le cas de protéines ancrées en membrane, certains segments transmembranaires hydrophobes peuvent traverser la micelle et donc interagir avec la partie apolaire de la micelle, tandis que d'autres seront dénaturés en surface [Dutta *et al.*, 2010a, Dutta *et al.*, 2010b, Krishnamani et Lanyi, 2012]. Dans les deux cas, les interactions (i) entre les chaînes alkyles du détergent et les régions hydrophobes des protéines et (ii) entre les têtes chargées du SDS et les résidus polaires et/ou chargés positivement sont responsables de la dénaturation des protéines [Gudiksen *et al.*, 2006, Tulumello et Deber, 2009, Bhuyan, 2010, Naidu et Prabhu, 2011, Tian *et al.*, 2012, Bello *et al.*, 2012].

Nous avons montré dans le chapitre 2 que l'ajout de concentrations mo-

laire de 2-méthyle-2,4-pentanediol (MPD) permet de changer les propriétés dénaturantes du SDS au profit de nouvelles propriétés capables d'induire le repliement de l'Omp2a [Roussel *et al.*, 2013a]. Cette tendance avait été également observée pour d'autres protéines solubles (L'anhydrase carbonique humaine et le lysozyme) et membranaire (PagP) [Michaux *et al.*, 2008b, Michaux *et al.*, 2008a, Cuesta-Seijo *et al.*, 2010, Roussel *et al.*, 2013b]. Malgré les différences majeures des protéines étudiées (soluble ou membranaire, monomérique ou multimérique), toutes ont pu être dénaturées et renaturées dans des conditions très similaires en associant le SDS (50 - 60 mM) au MPD (1 - 2 M). Le système de renaturation semble donc dépendre du rapport entre le détergent et le cosolvant.

Le mécanisme par lequel le MPD altère les propriétés dénaturantes du SDS n'est pas encore connu. Toutefois, de nombreuses études impliquant des mélanges alcool-SDS ont montré que les alcools ont un effet sur la taille, la forme et la stabilité des micelles [Zana, 1995]. Deux catégories d'alcools ont été définies : (i) Les alcools à courte chaîne carbonée (1 à 3 atomes de carbone), qui sont solubles en toute proportion dans la phase aqueuse [Safarpour *et al.*, 1999]. Ceux-ci affectent la stabilité des micelles en réduisant la polarité du solvant. Ainsi, le méthanol, l'éthanol et le propanol induisent des micelles de plus petites dimensions et peuvent mener à la désagrégation de la micelle à des concentrations de 11, 5 et 3.5 M respectivement [Stilbs, 1982]. (ii) Les alcools ayant une longue chaîne carbonée (4 atomes de carbone et plus) et qui ne sont solubles qu'à faible concentration (< 0.5 M) [Forland *et al.*, 1994]. Ces molécules interagissent directement avec la micelle et s'y retrouvent souvent incorporées [Stephany *et al.*, 1994]. Par exemple, la taille des micelles a tendance à augmenter en présence de concentrations en butanol (< 0.5 M), pentanol (0.1 M) et hexanol (0.1 M) [Candau *et al.*, 1982, Sarma *et al.*, 2011].

A cause de la faible solubilité de ces alcools à longues chaînes, les études sont souvent limitées à des gammes de concentrations (0.1 à 0.5 M) bien inférieures à la concentration en MPD nécessaire pour induire le repliement de protéines (1.5 M). De plus, les interactions entre la micelle et l'alcool semblent changer en fonction de la position ou du nombre de groupement(s) hydroxyle(s) sur la chaîne carbonée (le comportement d'une micelle en présence de 1-pentanol est différent de celui en présence de 2-pentanol par exemple [Akhter, 1999]) ; et de la présence de groupements chimiques additionnels (méthyle par exemple) [Hoi-land *et al.*, 1984, Sarma *et al.*, 2011]. Les prédictions de comportement sont donc quasiment impossibles. Enfin, il n'existe actuellement aucune étude théorique sur le comportement de micelle de détergent en présence d'un cosolvant limitant fortement la compréhension de tels systèmes.

4.1.1 Objectifs et stratégie

L'objectif général de ce chapitre est de mettre en évidence l'effet du cosolvant sur le détergent et d'identifier les interactions spécifiques entre le SDS et le MPD. Dans ce cadre, des études expérimentales basées sur la diffusion lumineuse dynamique seront menées afin de déterminer la stabilité des micelles en solution en présence de différentes concentrations en cosolvant. Ces résultats

seront combinés avec des modèles théoriques. Deux types de simulations seront réalisées : (i) un modèle en “gros-grain” (GG) permettant de modéliser de nombreuses combinaisons SDS/MPD et d’observer un effet global du cosolvant sur les micelles de détergent et (ii) un modèle atomistique unifié (AU) qui permettra d’identifier les interactions spécifiques entre le SDS et le MPD.

4.2 Matériel et Méthodes

4.2.1 Diffusion lumineuse dynamique

Les échantillons (1 mL) sont préparés à partir de solutions stocks de détergent (600 mM SDS, 200 mM tampon phosphate pH 7.4) et de cosolvant (8.4 M) dans de l’eau milli-Q. La concentration finale du SDS est de 60 mM et celle du MPD varie de 0 à 2 M. Avant chaque mesure, les échantillons sont filtrés (Polypropylène ; 0.22 μ m), centrifugés une minute à 14.000 g afin d’éliminer les impuretés qui pourraient affecter les mesures (poussières, particules non solubilisées) et laissés une heure à température ambiante. Les mesures sont réalisées sur un Zetasizer Malvern 2000 à l’aide d’un faisceau laser hélium-néon (633 nm) et la quantité de lumière diffusée est mesurée par un détecteur placé à un angle de 173° par rapport au faisceau incident. Les dimensions des particules obtenues sont le résultat de moyennes sur dix accumulations et les barres d’erreur associées correspondent à trois échantillons indépendants.

4.2.2 Dynamique moléculaire

Toutes les simulations ont été réalisées en utilisant le programme GROMACS [Hess *et al.*, 2008] (Version 4.5.5.). Pour tous les systèmes modélisés, la configuration initiale est optimisée par la méthode “steepest-descent” [Henkelman et Jónsson, 2000] et toutes les simulations sont réalisées dans l’ensemble “isothermique-isobarique (NPT)” où le nombre de particules, la température et la pression sont des constantes. Ainsi, chaque groupe de calcul (SDS, MPD, eau et ions) est couplé à un thermostat (323K) et un barostat (1 bar) [Berendsen *et al.*, 1984] afin de s’approcher au maximum des conditions expérimentales. Les positions au sein des trajectoires atomiques sont calculées toutes les 40 ou 2 fs pour le modèle GG et AU respectivement. L’analyse des résultats est réalisée à l’aide des outils implémentés dans GROMACS. VMD [Humphrey *et al.*, 1996] et PyMol (DeLano Scientific, San Carlos, CA) sont utilisés pour la visualisation.

Modèle “Gros grains” (GG). Le champ de forces MARTINI (version 1.6, [Marrink *et al.*, 2007]) est utilisé. Les paramètres GG du SDS, de l’ion Na⁺ et des molécules d’eau sont tels que précédemment publiés [Jalili et Akhavan, 2009, Jalili et Akhavan, 2011]. Des micelles constituées d’un nombre croissant de molécules de SDS (de 60 à 200, correspondant au nombre d’agrégation) ont été préformées à l’aide du programme Packmol [Martínez *et al.*, 2009] et des simulations (20 ns) ont permis d’obtenir la structure finale des micelles en solution (Figure 4.1, A). Une des caractéristiques principales est leur formes que l’on peut relier à leur excentricité (e). Celle-ci peut être calculée à partir

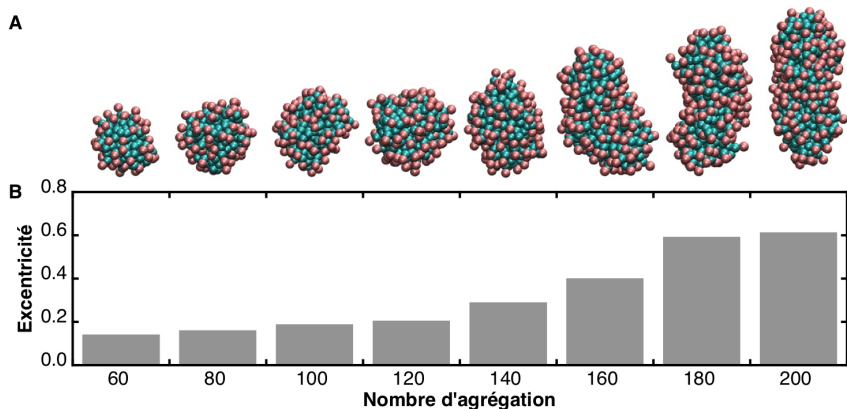


Figure 4.1 – Formation de micelles dont le nombre d’agrégation varie de 60 à 200 molécules de SDS. (A) Structure finale obtenue après 20 ns de simulation. (B) Excentricité des micelles en fonction du nombre d’agrégation.

des moments d’inertie (I) selon les trois axes (x , y et z) de la micelle [Mackerell, 1995] :

$$e = 1 - \frac{I_{\text{minimal}}}{I_{\text{moyen}}}$$

La valeur de l’excentricité peut donc varier de 0, pour une structure parfaitement sphérique, à 1, pour une structure en “fil”. Les micelles contenant jusqu’à 120 molécules de SDS restent plus ou moins sphériques (sphère légèrement aplatie sur l’un des axes) les valeurs e restent comprises entre 0 et 0.2 (Figure 4.1, B) et tel que précédemment mentionné [Jalili et Akhavan, 2009]. Au-dessus de ce nombre d’agrégation, l’excentricité augmente et les micelles s’allongent, en accord avec de précédentes observations expérimentales [Quina *et al.*, 1995] et théoriques [Sangwai et Sureshkumar, 2011].

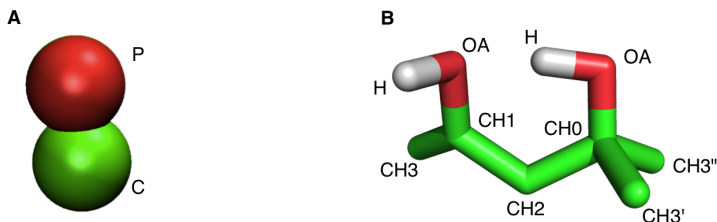


Figure 4.2 – Représentation théorique de la molécule de MPD pour le modèle en gros grains (A) et atomistique (B). Les types d’atomes sélectionnés sont représentés.

La molécule de MPD (Figure 4.2, **A**) est décrite par une particule polaire (type P, rouge), représentant les deux groupements hydroxyles, et une particule apolaire (type C, verte) mimant la partie alkyle du cosolvant, en accord avec les propriétés amphipatiques du MPD. Des simulations (20 ns) impliquant 1500 molécules de cosolvant dans une boîte (13x13x13 Å) contenant 18 222 molécules d'eau (± 55 M) montrent que les molécules de MPD restent isolées les unes des autres et qu'aucune séparation de phase n'est observée en accord avec les observations expérimentales. De plus, les simulations montrent que la densité du système (978 kg/m^3) est identique à la valeur expérimentale (978 kg/m^3), supportant le modèle ainsi construit.

Modèle “atomistique unifié” (AU). Le champ de forces unifié gromos96 53A6 est utilisé [Oostenbrink *et al.*, 2004]. Les paramètres du SDS, de l'ion Na^+ et des molécules d'eau (SPC) sont tels que cité au chapitre précédent. La micelle (60 mM) a été construite à l'aide du programme Packmol [Martínez *et al.*, 2009] à partir de 60 molécules de SDS afin de correspondre au nombre d'agrégation expérimental [Quina *et al.*, 1995] utilisé dans de précédentes études théoriques [Bruce *et al.*, 2002a, Sammalkorpi *et al.*, 2007, Yan *et al.*, 2010]. Les paramètres du MPD (Figure 4.2, **B**) sont obtenus après optimisation de la structure et de la distribution des charges partielles par l'utilisation de la mécanique quantique (Table ??). Des simulations (20 ns) impliquant 1 500 molécules de cosolvant (± 1.5 M) dans une boîte 13x13x13 Å) contenant 51 182 molécules d'eau (± 55 M) montrent que, comme avec le modèle GG, les molécules de MPD restent isolées les unes des autres et qu'aucune séparation de phase n'est observée en accord avec les observations expérimentales. La densité théorique du système (974 kg/m^3) est proche de la valeur expérimentale (978 kg/m^3), supportant notre modèle.

4.3 Résultats

4.3.1 Effet du MPD sur une micelle de SDS

L'analyse de l'effet du MPD sur des micelles de SDS a été effectué en combinant des études expérimentales (DLD) et théoriques (modèle GG). Dans un premier temps, le rayon moyen de particules de SDS (60 mM, au-dessus de la CMC) en contact avec le MPD à différentes concentrations (0.1 à 2.0 M) a été mesuré par DLD (Figure 4.3, **A**) et des simulations (GG) ont ensuite été réalisées afin de pouvoir simuler les nombreuses combinaisons SDS/MPD. Les systèmes modélisés impliquent tous une micelle (60 mM ou 60 molécules de SDS), et des concentrations croissantes en MPD allant de 0.1 à 2.0 M (de 100 à 2000 molécules). Les situations obtenues en fin de simulation (200 ns) sont représentées à la figure 4.4 où différentes situations sont observées, allant du maintien de la structure micellaire (voir à 0.5 M MPD par exemple) à la dissociation de la micelle (voir à 2.0 M). Chaque mélange a été caractérisé par le nombre de groupe(s) de SDS en solution (●) et le nombre d'agrégation (◆) correspondant au nombre de molécules de SDS dans le plus grand groupe observé (Figure 4.3, **B**). Les résultats expérimentaux et théoriques s'accordent

Table 4.1 – Paramètres du MPD optimisés pour le champ de forces gormos96 53A6.

Charges partielles						
<i>i</i>	<i>q(e)</i>					
H	+0.394					
OA	-0.705					
CH0	+0.646					
CH1	+0.518					
CH2	-0.066					
CH3	-0.157					
Longueurs de liaisons						
<i>i</i>	<i>j</i>	<i>b</i> ₀ (nm)	<i>k</i> _b (10 ⁶ kJ mol ⁻¹ nm ⁻⁴)			
H	OA	0.096	15.70			
OA	CH0	0.145	10.20			
OA	CH1	0.143	8.18			
CHn	CHn	0.153	7.15			
Angles						
<i>i</i>	<i>j</i>	<i>k</i>	<i>θ</i> ₀ (deg.)	<i>k</i> _θ (kJ mol ⁻¹)		
CHn	CHn	CHn	112.4	530.0		
CHn	CHn	OA	109.2	530.0		
CHn	OA	H	108.5	443.0		
Dihèdres						
<i>i</i>	<i>j</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>Φ</i> ₀ (deg.)	<i>k</i> _Φ (kJ mol ⁻¹)	m
CH3''	CH0	OA	H	53.3	3.90	3
CH3'	CH0	CH2	CH1	177.1	5.92	3
CH0	CH2	CH1	OA	-80.0	2.67	1
CH3'	CH0	OA	H	-66.5	3.90	3
CH3''	CH0	CH2	CH1	59.4	5.92	3
CH2	CH0	OA	H	176.7	3.90	3
CH2	CH1	OA	H	178.9	3.90	3
CH1	CH2	OA	H	-59.1	3.90	3

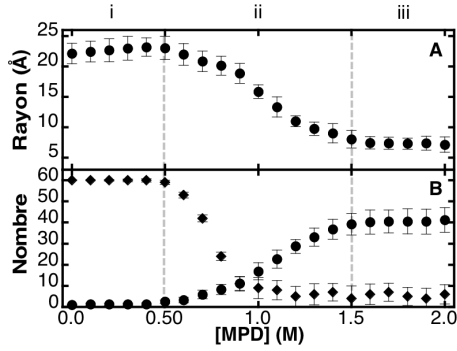


Figure 4.3 – Dissociation des micelles de SDS en présence du cosolvant. (A) Rayon moyen des particules de SDS (60 mM) en solution en fonction de la concentration en MPD (0 à 2.0 M) obtenu par diffusion lumineuse dynamique (DLD). Les barres d’erreurs associées correspondent à trois échantillons indépendants. (B) Variation du nombre de groupes de SDS (●) et du nombre d’agrégation (◆) en fonction de la concentration en MPD obtenus par le modèle théorique GG. Les barres d’erreurs correspondent à la variation sur les 20 dernières nanosecondes de simulation.

parfaitement sur la dissociation de la micelle en présence de MPD et trois régions sont identifiées : (i) De 0.1 à 0.5 M MPD, l’ajout de cosolvant induit une légère augmentation de la taille des micelles puisque le rayon passe de 22.2 ± 0.9 à 24.4 ± 1.3 Å (Figure 4.3, A) et une légère déformation de la micelle est observée (Figure 4.4, 0.3 M). Ces observations sont en accord avec de précédents résultats expérimentaux montrant que certains alcools à longues chaînes carbonées (1-pentanol par exemple) peuvent s’insérer dans la micelle à faible concentration induisant un léger changement de forme [Forland *et al.*, 1994, Akhter, 1999]. Les simulations montrent que sans le MPD le nombre de groupes de SDS reste à une valeur de 1 tandis que le nombre d’agrégation est de 60, indiquant que toutes les molécules de SDS sont impliquées dans une seule micelle. En présence de faibles concentrations en MPD (< 0.5 M), les résultats expérimentaux et théoriques montrent que la micelle reste stable mais que sa forme varie légèrement. (ii) En présence du cosolvant en concentrations moyennes (0.6 à 1.5 M), le rayon moyen diminue jusqu’à atteindre une valeur de 8.0 ± 1.4 Å (Figure 4.3, A), ce qui reflète la dissociation de la micelle. Les modèles théoriques indiquent que le nombre de groupes de SDS passe de 1 (la micelle unique) à 40.7 ± 1.1 (Figure 4.3, B, ●) et que le nombre d’agrégation passe de 60 à 6.9 ± 1.1 molécules (◆). Ces résultats sont cohérents avec le démantèlement de la micelle observé lors d’ajout de concentrations molaires de certains alcools tels que le propanol [Safarpour *et al.*, 1999, Forland *et al.*, 1994] et le butanol [Stilbs, 1982]. (iii) A des concentrations en MPD supérieures à 1.5 M, aucun changement n’est observé et les valeurs du rayon moyen des particules, du nombre de groupes de SDS et d’agrégation obtenus atteignent un maximum et n’évoluent plus. Des petits groupes de SDS (maxi-

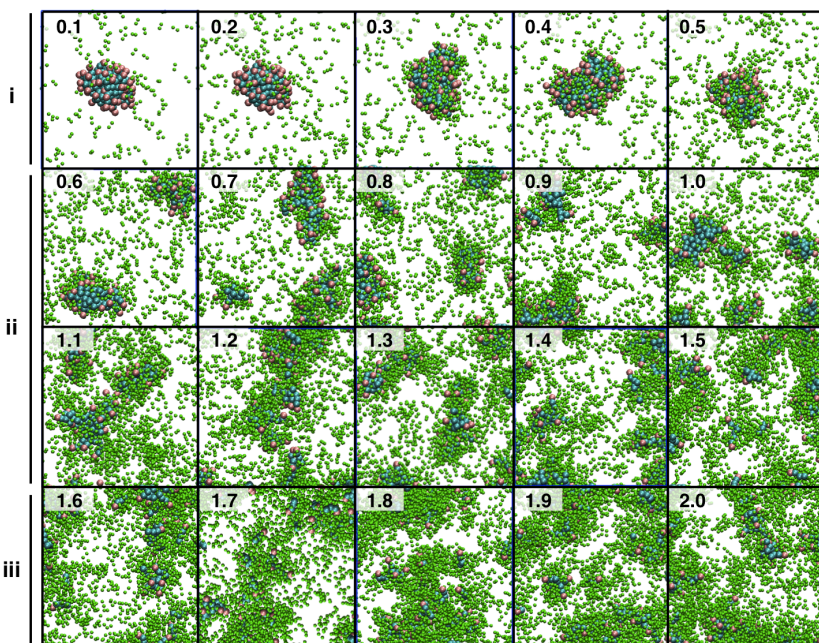


Figure 4.4 – Situations obtenues en fin de simulations GG (200 ns) de micelles de SDS (60 mM) en présence de concentrations croissantes en MPD (0.1 à 2.0 M, encart). Le SDS est représenté en rose pour la tête et cyan pour les chaînes alkyles. Le MPD est représenté en vert. Les trois régions mises en évidence (i, ii, iii) sont en lien avec la Figure 4.3.

mum 7 molécules) sont encore observés (Figure 4.4, 2.0 M) dans cette gamme de concentrations.

Résumé. Les résultats expérimentaux et théoriques mènent donc aux mêmes conclusions et déterminent que la dissociation de la micelle commence à la concentration critique en MPD de 0.6 M et est complète en présence d’une concentration de 1.5 M en cosolvant. Il est intéressant de noter que ce rapport particulier (60 mM SDS et 1.5 M MPD) est le même que celui qui induit les meilleurs rendements de renaturation de protéines [Roussel *et al.*, 2013b, Michaux *et al.*, 2008a, Roussel *et al.*, 2013a], ce qui suggère l’importance de la dissociation de la micelle dans le processus de renaturation.

4.3.2 Importance du rapport SDS/MPD

Le modèle GG a été utilisé pour déterminer l’influence du rapport SDS/MPD sur la dissociation de la micelle. Des micelles dont le nombre d’agrégation varie de 60 à 200 molécules (correspondant à des concentrations en SDS de 60 à 200 mM) ont été mises en présence du cosolvant à différentes concentrations et l’efficacité de dissociation des micelles (EDM) a été reportée pour chaque

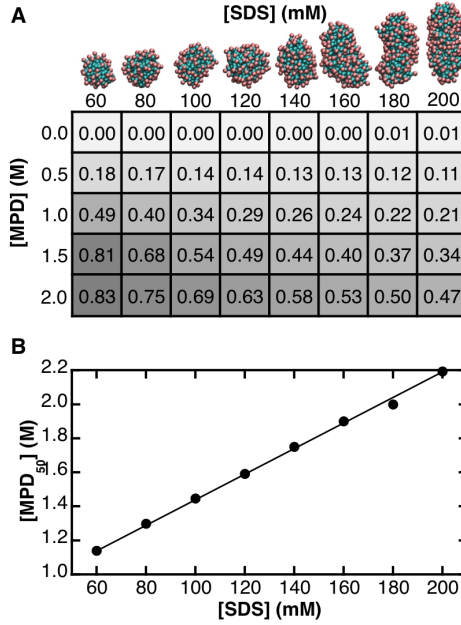


Figure 4.5 – Influence du ratio SDS/MPD sur la dissociation des micelles. (A) Efficacité de dissociation de micelles ($EDM = N_{\text{groupes}}/N_{\text{SDStot}}$) en fonction des concentration en SDS et MPD. (B) Concentration en cosolvant nécessaire pour obtenir une valeur EDM de 0.5 ($[MPD]_{50}$).

combinaison SDS/MPD (Figure 4.5, **A**), telle que :

$$EDM = \frac{\text{Nombre de groupes}}{\text{Nombre total de molécules de SDS}}$$

On observe ainsi que pour toutes les concentrations en détergent, plus la concentration en cosolvant est élevée, meilleure est la dissociation de la micelle. Par exemple, pour une concentration en SDS de 60 mM, la valeur EDM passe de 0 en absence de cosolvant à 0.83 en présence de 2.0 M MPD, confirmant la dissociation presque complète de la micelle. Pour une concentration spécifique en MPD, la valeur de l'EDM diminue lorsque la concentration en SDS augmente. Ainsi, en présence de 1.5 M MPD, cette valeur diminue de 0.81 à 0.34 lorsque l'on passe de 60 à 200 mM SDS. Pour chaque concentration en SDS (correspondant à chaque colonne), les concentrations en MPD induisant une EDM de 0.5 ($[MPD]_{50}$) ont été calculées à partir de régressions linéaires (Figure 4.5, **B**). Il est ainsi évident que plus la concentration en SDS est élevée, plus la concentration en MPD nécessaire pour induire la dissociation de la micelle est élevée. Ce mécanisme est donc dépendant du rapport entre le détergent et le cosolvant.

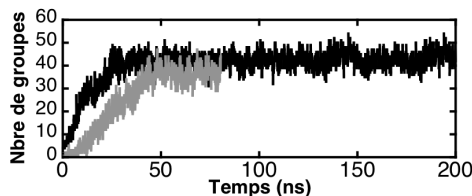


Figure 4.6 – Comparaison de la dissociation de la micelle de détergent (60 mM) en présence du cosolvant (1.5 M) en suivant l’évolution du nombre de groupes de SDS en fonction du temps pour le modèle en gros grains (ligne noire) et atomistique (gris).

4.3.3 Interactions spécifiques entre le détergent et le cosolvant

La dissociation de la micelle (60 mM SDS) étant optimale en présence de 1.5 M MPD, un modèle atomistique unifié (AU ; les hydrogènes non polaires ne sont pas représentés) a été construit dans des conditions similaires. Ainsi, une boîte (13x13x13 Å) contenant une micelle préformée (60 mM), 1500 molécules de MPD réparties de manière aléatoire, 60 ions Na^+ et 48 882 molécules d’eau a été modélisée. En présence de MPD, la micelle se dissocie tel qu’observé précédemment (Figure 4.6) et le nombre de groupes de SDS en fin de simulation (60 ns) atteint une valeur similaire (38.4 ± 1.6 , ligne grise) au modèle GG (40.2 ± 1.1 , ligne noire).

Au début de la simulation, la micelle interagit avec les molécules d’eau formant en moyenne 7.7 ± 1.0 ponts hydrogène avec chaque tête polaire des molécules de SDS (Figure 4.7, **C**). Rapidement, les molécules de cosolvant en solution entrent en contact avec la surface de la micelle (Figure 4.8, 0.2 ns) et les fonctions hydroxyles du MPD peuvent également interagir avec les groupements sulfates présents à la surface micellaire (Figure 4.7, **A**). Le nombre de ponts hydrogènes avec les molécules d’eau (trait bleu) diminue au profit de nouvelles liaisons hydrogènes avec le MPD (trait rouge). L’effet de répulsion entre les charges négatives du SDS est donc atténué par la présence de molécules de MPD, permettant la déformation de la micelle qui passe alors d’une forme sphérique à une forme oblate (Figure 4.8, 8 ns). Dans cette configuration, les chaînes hydrocarbonées du SDS sont plus accessibles et les molécules de MPD peuvent désormais interagir et exposer leur partie alkyle à la partie hydrophobe du détergent. Le nombre de molécules de MPD en contact avec le SDS augmente donc régulièrement au cours des simulations (Figure 4.7, **B**, trait rouge) jusqu’à atteindre une valeur de 12.3 ± 0.4 molécules. En conséquence, le nombre de molécules d’eau présentes autour de la molécule de SDS diminue passant de 7 à environ 3.1 ± 0.5 molécules. Ces valeurs indiquent donc que lors de la dissociation de la micelle, le SDS est exclusivement solvaté par les molécules de MPD qui protègent la partie hydrophobe du détergent de l’eau en exposant leur partie alkyle (Figure 4.7, **E**). Cette organisation des molécules de cosolvant au-

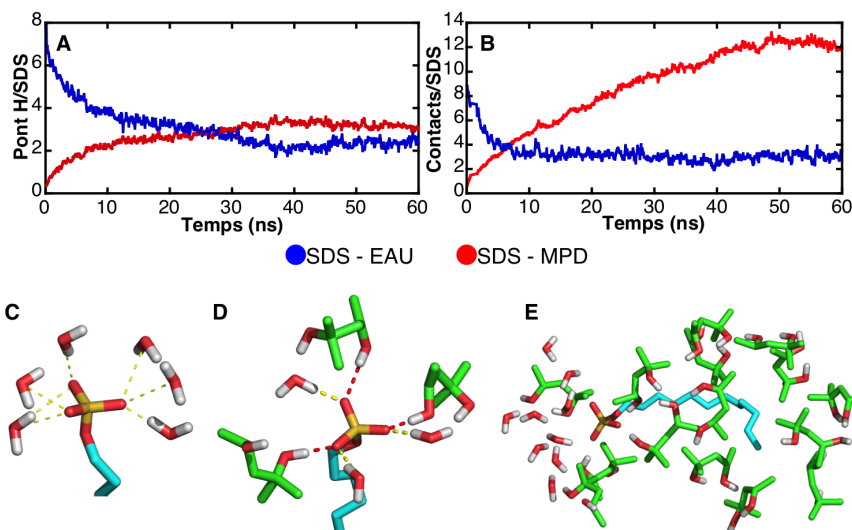


Figure 4.7 – Interactions spécifiques entre le détergent et le cosolvant identifiée par des simulations AU. (A) Nombre de ponts hydrogènes formés entre le SDS et le solvant (bleu) ou le MPD (rouge). (B) Nombre de contacts atomiques ($d < 3.5 \text{ \AA}$) entre le détergent et les molécules d’eau (bleu) ou le cosolvant (rouge). (C) Configuration type de molécules d’eau solvantant la tête polaire du SDS impliqué dans la micelle. (D) Situation obtenue en fin de simulation où le MPD remplace partiellement les molécules d’eau. (E) Environnement d’une molécule de SDS solvatée par le MPD.

tour du SDS permet la dissociation complète de la micelle en fin de simulation (Figure 4.8, 60 ns). Au final, 3.4 ± 0.2 molécules de MPD sont observées autour de la tête polaire du détergent formant 3.6 ± 0.4 ponts hydrogènes (Figure 4.7, D, rouge). Le MPD joue donc un double rôle en couvrant les chaînes alkyles du détergent et le groupement sulfate de la molécule de SDS, qui sont deux éléments responsables de la dénaturation des protéines [Bhuyan, 2010, Otzen, 2002]. Ces observations peuvent donc expliquer comment le MPD modifie les propriétés dénaturantes du SDS et permet même le repliement des protéines.

4.4 Conclusions

En combinant des approches expérimentales et théoriques, il a été possible de mettre en évidence l’évolution d’un système complexe faisant intervenir une micelle et un cosolvant. Une première étape combinant la diffusion lumineuse avec des simulations en gros grains a permis de comprendre l’effet global du MPD sur la stabilité d’une micelle de SDS. Il a ainsi été montré que des concentrations molaires en cosolvant induisent le démantèlement de la micelle de SDS. En effet, à partir d’une certaine concentration critique (0.6 M), les micelles de SDS commencent à se dissocier et le processus est complet lorsque la concentra-

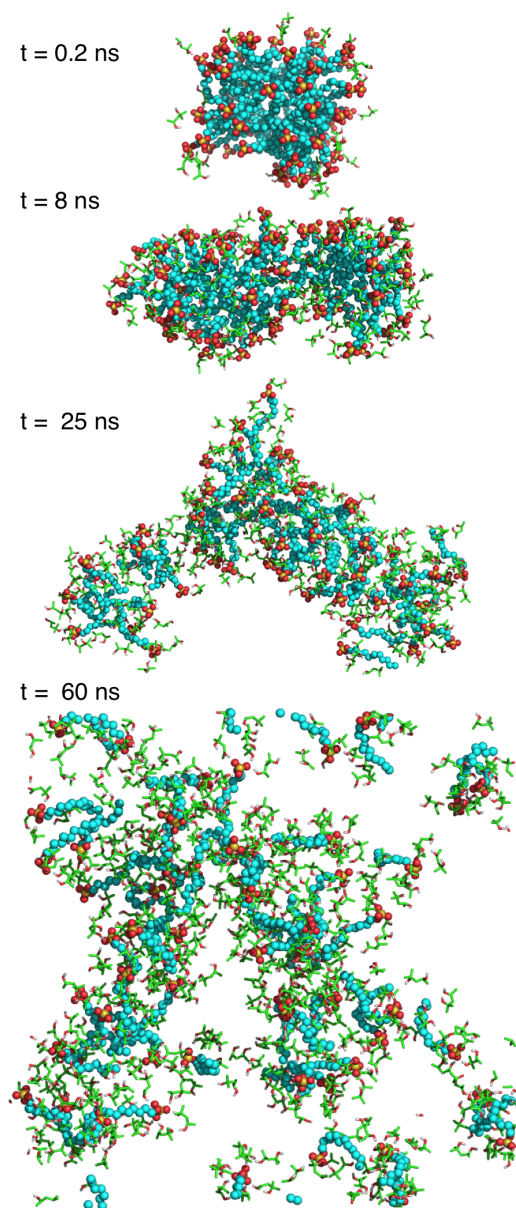


Figure 4.8 – Dissociation de la micelle de SDS (têtes polaires en rose et chaînes alkyles en cyan) en présence de 1.5 M MPD (vert) observée par DM à résolution AU. Afin de faciliter la visualisation, seules les molécules de MPD proches ($d < 4 \text{ \AA}$) du SDS sont représentées.

tion en MPD atteint une valeur de 1.5 M. Le rapport SDS/MPD identifié (60 mM et 1.5 M, respectivement) correspond parfaitement aux concentrations induisant le repliement optimal de protéines. Une seconde étape faisant intervenir des simulations à une résolution atomistique a permis d'identifier les interactions spécifiques entre les deux partenaires. Les molécules de MPD réalisent dans un premier temps des ponts hydrogènes avec les groupements sulfates des têtes polaires et couvrent ensuite les chaînes alkyles du SDS, modifiant ainsi les propriétés dénaturantes du détergent.

Le système SDS/MPD appliqué à des peptides modèles

5.1 Introduction

Les deux chapitres précédents ont permis d'identifier séparément les interactions peptide-détergent et détergent-cosolvant. D'un côté, il a été montré que le SDS se lie aux peptides et induit leur dénaturation suite aux interactions avec le groupement sulfate négativement chargé et la chaîne hydrophobe du détergent. De l'autre, la dissociation de la micelle par le cosolvant a été attribuée à la capacité du MPD à couvrir les chaînes apolaires du détergent et à interagir spécifiquement avec la tête chargée de ce dernier. Au cours de ce chapitre, les trois partenaires vont être combinés afin de mettre en évidence le mécanisme par lequel le MPD peut induire le repliement de peptides dénaturés par le SDS.

5.2 Objectifs et stratégie

Les objectifs généraux de ce chapitre sont de mettre en évidence la capacité du MPD à (i) induire une résistance à la dénaturation par le SDS et (ii) de permettre le repliement de peptides préalablement dénaturés par le détergent.

Pour commencer, les deux peptides natifs seront d'abord mis en solution en présence de différentes concentrations en MPD et le SDS sera ensuite ajouté dans le milieu. Des mesures de fluorescence intrinsèque et de dichroïsme circulaire permettront de déterminer la concentration minimale en cosolvant induisant la résistance à la dénaturation. Les modèles théoriques (dynamique moléculaire) seront ensuite utilisés afin de mettre en évidence les mécanismes associés.

Ensuite, des échantillons dépliés par le SDS seront repliés en ajoutant le cosolvant. Encore une fois, les mesures spectroscopiques permettront de

déterminer les concentrations en MPD nécessaires pour induire le processus de renaturation et le ratio détergent/cosolvant idéal. Les simulations permettront d’identifier les interactions spécifiques entre le peptide, le détergent et le cosolvant, menant à la renaturation des peptides.

Finalement, en étudiant le repliement des peptides en présence de différents cosolvants, il sera possible de mettre en évidence les caractéristiques communes des alcools capables d’induire le repliement, permettant éventuellement de proposer de nouveaux couples détergent/cosolvant.

5.3 Matériel et Méthodes

5.3.1 Fluorescence intrinsèque

Les échantillons peptidiques (0.5 mg/mL) sont préparés dans 20 mM tampon phosphate pH 7.4, différentes concentrations en SDS (de 10 à 100 mM) et en MPD (de 0 à 2.5 M). Les mesures sont réalisées à température ambiante sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer LS-45 à l’aide de cellules (UVette) ayant un chemin optique de 2 mm. La longueur d’onde d’excitation est fixée à 280 nm tandis que l’émission de fluorescence est mesurée entre 300 et 500 nm avec une vitesse de 200 nm.min⁻¹ et une résolution de 0.5 nm. Les spectres obtenus pour les références (en absence de peptide) sont soustraits et la moyenne de 3 spectres est réalisée.

5.3.2 Dichroïsme circulaire.

Les peptides (0.1 mg/mL) sont solubilisés dans 20 mM tampon phosphate pH 7.4, 60 mM SDS et 1.5 M MPD. Les mesures sont réalisées sur un spectropolarimètre Jasco J-810. Les spectres sont acquis à une vitesse de 10 nm min⁻¹ avec une résolution de 0.2 nm et un temps d’intégration de 4 secondes. La moyenne de 4 accumulations est réalisée et les spectres correspondant aux références (en absence de peptide) sont soustraits de la moyenne.

5.3.3 Dynamique moléculaire

Toutes les simulations ont été réalisées en utilisant le programme GRO-MACS [Hess *et al.*, 2008] (Version 4.5.5.) et le champ de forces unifié gromos96 53A6 [Oostenbrink *et al.*, 2004]. Les paramètres du SDS et du MPD sont tels que décrits dans les chapitres précédents et le solvant est représenté de manière explicite en utilisant le modèle “single-point-charge” (SPC) préalablement utilisé dans des études similaires [Zhou, 2003, Settanni et Fersht, 2008]. Les structures natives obtenues par résonance magnétique nucléaire du TrpCage (PDB : 1L2Y [Neidigh *et al.*, 2002]) et du TrpZip (PDB : 1LE0 [Cochran *et al.*, 2001]) ont été utilisées comme point de départ pour les simulations, après avoir été optimisées afin de correspondre aux critères d’utilisation du champ de forces unifié gromos96 53A5. Les structures des peptides dépliés en surface de micelle sont récupérées à partir des simulations précédentes.

Pour tous les systèmes modélisés, la configuration initiale est optimisée par la méthode “steepest-descent” [Henkelman et Jónsson, 2000]. Toutes les simulations sont réalisées dans l’ensemble “isothermique-isobarique (NPT)” où le nombre de particules, la température et la pression sont des constantes. Ainsi, chaque groupe de calcul (peptide, détergent, eau, ions) est couplé à un thermostat (323 K) et un barostat (1 bar) [Berendsen *et al.*, 1984] afin de s’approcher au maximum des conditions expérimentales. Les positions au sein des trajectoires atomiques (100 ns) sont calculées toutes les 2 fs. L’analyse des résultats est réalisée à l’aide des outils implémentés dans GROMACS. VMD [Humphrey *et al.*, 1996] et PyMol (DeLano Scientific, San Carlos, CA) sont utilisés pour la visualisation.

5.3.4 Chromatographie d’exclusion

Méthode.

Paramètres expérimentaux. Les échantillons peptidiques (0.5 mg/mL) sont préparés dans 20 mM tampon phosphate pH 7.4 (+ 60 mM SDS ou + 8 M urée ou + 1.5 M MPD ou + 60 mM SDS et 1.5 M MPD) et filtrés (0.22 μ m) avant d’être chargés sur une colone Superdex Peptide 10/300 GL préalablement équilibrée par deux volumes de tampon. Le flux de tampon est fixé à 0.5 mL afin d’optimiser la séparation des peptides et l’élution est suivie par l’absorbance à 280 nm. Entre chaque échantillon, la colonne est nettoyée par deux volumes d’eau et reconditionnée dans le tampon adéquat.

5.4 Résultats

5.4.1 Résistance à la dénaturation par le SDS

Le peptide Trpcage. Pour commencer, la stabilité du peptide en présence de MPD a été mise en évidence en solubilisant le peptide dans un tampon contenant le MPD. La présence du cosolvant (1.5 M) ne semble pas affecter la structure du peptide puisque le spectre d’émission de fluorescence intrinsèque (FI) (Figure 5.1, **A**, ligne verte) est identique à l’échantillon natif (ligne noire). Les simulations (100 ns) faisant intervenir le peptide et des molécules de MPD (1.5 M) montrent que le cosolvant interagit avec le Trpcage et remplace partiellement les molécules d’eau présentes autour du peptide (Figure 5.2). En effet, le nombre de contacts atomiques avec les molécules d’eau passe de 489 ± 2 à 316 ± 4 atomes tandis que celui avec le cosolvant augmente jusqu’à 145 ± 2 atomes en fin de simulation. La présence du MPD autour du peptide n’affecte ni la structure tertiaire du peptide, tel qu’observé par le R_g (Figure 5.2, **A**, trait noir) qui reste identique au peptide natif (en absence de MPD, trait gris), ni la structure secondaire puisqu’on retrouve en fin de simulation l’hélice α (**B**). Ainsi, le peptide se retrouve entouré de molécules de MPD et d’eau (**C**).

Afin de mettre en évidence la capacité du MPD à induire une résistance à la dénaturation par le SDS, le peptide a été incubé une heure en présence de différentes concentrations en cosolvant (de 0 à 2.5 M) et le détergent (60 mM) a

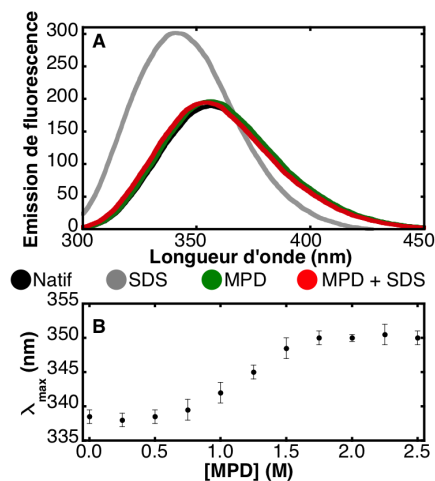


Figure 5.1 – Mise en évidence de la résistance à la dénaturation du Trpcage par le SDS en présence de MPD par fluorescence intrinsèque. (A) Spectres correspondant au peptide natif (noir), en présence de 60 mM SDS (gris), 1.5 M MPD (vert) et 1.5 M MPD + 60 mM SDS (rouge). (B) Longueur d’onde correspondant à l’intensité d’émission maximale (λ_{max}) reportée en fonction de la concentration en MPD. Les barres d’erreurs correspondent à trois échantillons indépendants.

ensuite été ajouté par dilution. La longueur d’onde correspondant à l’émission maximale (λ_{max}) peut varier de 351.5 ± 0.5 nm pour l’échantillon natif (Figure 5.1, A, ligne noire) ou en présence de MPD seul (ligne verte) à 338.0 ± 1.0 nm lorsque le peptide est dénaturé dans le SDS (spectre gris). En reportant la λ_{max} en fonction de la concentration en cosolvant (figure 5.1, B), on observe qu’en dessous d’une certaine concentration en MPD (< 0.75 M), les échantillons sont complètement dépliés ($\lambda_{\text{max}} \approx 338.5 \pm 1.0$ nm) par le SDS ce qui indique que le cosolvant n’est pas en concentration suffisante pour inverser les propriétés dénaturante du détergent. Lorsque la concentration en MPD est supérieure ou égale à 1.5 M, les échantillons ne sont pas dépliés malgré l’ajout de SDS (60 mM) et la λ_{max} (351.0 ± 0.5 nm) est équivalente à l’échantillon natif, indiquant que le cosolvant est en concentration suffisante pour protéger le peptide de la dénaturation par le détergent. Les simulations montrent que le SDS n’interagit presque pas avec le peptide (3 ± 1 contacts) et que les valeurs correspondant aux nombre de contacts avec l’eau (318 ± 2) ou le MPD (115 ± 1) sont similaires à celles obtenues en absence de détergent. Le SDS ne pouvant pas interagir avec le peptide suite à la présence du MPD, celui ci ne se dépie donc pas et conserve sa structure tertiaire, observée par le R_g qui ne varie pas (Figure 5.2, D), et secondaire, observé par la structure en épingle β qui ne varie pas au cours des simulations (E). Ainsi, en fin de simulation, on observe que les molécules de MPD entourant le peptide réduisent les interactions directes entre le SDS et le Trpcage, bien que certaines molécules soient observées dans l’environnement

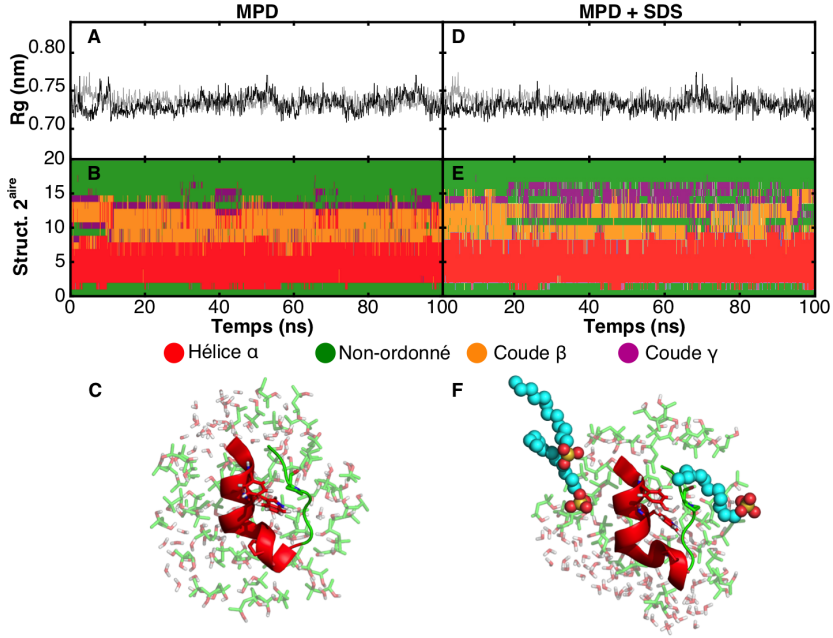


Figure 5.2 – Résistance à la dénaturation du peptide Trpcage par le SDS en présence de MPD observée par dynamique moléculaire. (A et D) Rayon de giration (R_g) du peptide natif (gris) ou en présence de, respectivement, MPD ou MPD+SDS. (B et E) Contenu en structures secondaires. (C et F) Situation finale obtenue en fin de simulations du peptide en présence de, respectivement, MPD seul ou MPD + SDS. Afin de faciliter la visualisation, seules les molécules situées à moins de 6 Å de la surface du peptide sont représentées.

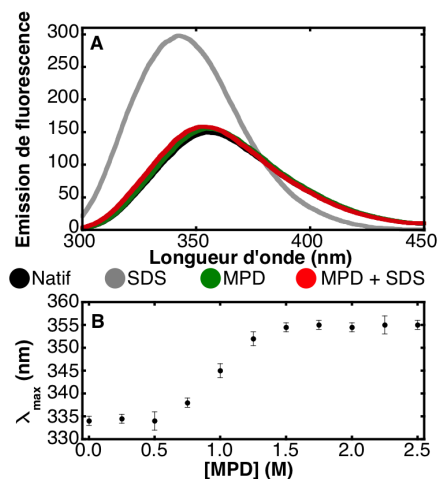


Figure 5.3 – Mise en évidence par fluorescence intrinsèque de la résistance à la dénaturation du Trpzip par le SDS en présence de MPD. (A) Spectres correspondant au peptide natif (noir), en présence de 60 mM SDS (gris), 1.5 M MPD (vert) et 1.5 M MPD + 60 mM SDS (rouge). (B) Longueur d’onde correspondant à l’intensité d’émission maximale (λ_{max}) reportée en fonction de la concentration en MPD.

du peptide (F).

Le peptide Trpzip. Comme pour le Trpcage, la présence de MPD (1.5 M) n’affecte pas la structure du peptide. En effet, le spectre d’émission de FI du Trpzip (Figure 5.3, A) en présence de MPD (ligne verte) est identique à l’échantillon natif (ligne noire). Les simulations (100 ns) mettent en évidence l’interaction du MPD avec le peptide et montrent que le nombre de contacts avec les molécules d’eau diminue de 478 ± 2 à 329 ± 4 , tandis que celui avec les molécules de MPD augmente jusqu’à atteindre la valeur de 96.7 ± 2.1 contacts. La valeur du Rg est stable et similaire à la situation native (Figure 5.4, A) ce qui indique que le MPD n’affecte pas la structure tertiaire du peptide. De même, la structure secondaire en épingle β est maintenue tout au long des simulations (B). Au final, le peptide est entouré de molécules de MPD, bien qu’il semble que le cosolvant interagisse principalement avec la face hydrophobe du peptide regroupant les 4 résidus tryptophanes (C).

La capacité du MPD à induire une résistance à la dénaturation du Trpzip a également été mise en évidence en incubant le peptide en présence de concentrations croissantes en MPD (0 à 2.5 M) pendant une heure, puis en ajoutant le SDS (60 mM) dans le tampon par dilution. Comme pour le Trpcage, à partir d’une certaine concentration (1.5 M), le MPD est capable d’empêcher la dénaturation du peptide (Figure 5.3, B), puisqu’on observe que les valeurs de λ_{max} (354.5 ± 1.0 nm) correspondent à l’échantillon natif. Le modèle théorique (Figure 5.4) montre que le nombre de contacts avec l’eau (342.1 ± 3.4) et avec

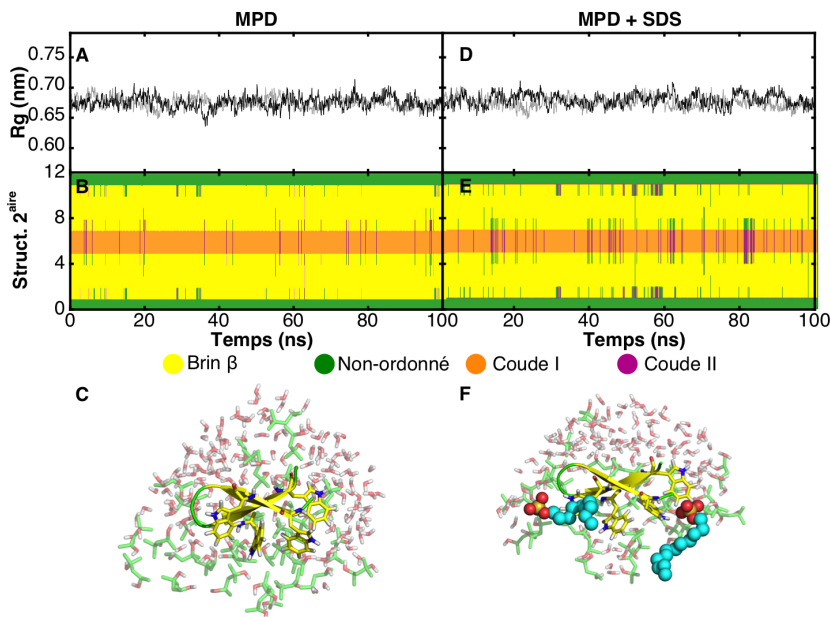


Figure 5.4 – Résistance à la dénaturation du peptide Trpzip par le SDS en présence de MPD observée par dynamique moléculaire. (A et D) Rayon de giration (R_g) du peptide natif (gris) ou en présence de MPD (A) ou MPD+SDS (D). (B et E) Variation du contenu en structures secondaires au cours des simulations impliquant le peptide en présence de MPD seul (B) ou additionné de SDS (E). (C et F) Situations finales obtenues en fin de simulations du peptide en présence de, respectivement, MPD seul ou MPD + SDS. Seules les molécules situées à moins de 6 Å de la surface du peptide sont représentées.

le MPD (90.8 ± 1.5) sont semblables à la situation sans détergent et que celui-ci n'interagit quasiment pas avec le peptide (2.2 ± 0.1), ce qui empêche d'induire la dénaturation du peptide. En effet, le R_g (D, trait noir) est identique à la situation native (gris) et le contenu en structures secondaires (E) ne varie pas. Au final, malgré une concentration importante en détergent (60 mM), seules quelques molécules de SDS se trouvent à proximité du peptide, expliquant la résistance à la dénaturation (F).

Résumé. Les deux peptides conservent une structure native en présence d'une concentration élevée (1.5 M) en MPD tel que précédemment observé [Michaux *et al.*, 2008a, Michaux *et al.*, 2008b]. Les résultats montrent que malgré la présence de MPD à relativement faible concentration (de 0 à 0.5 M), les peptides sont dépliés lorsque le SDS (60 mM) est ajouté au système. Une gamme intermédiaire de concentrations en cosolvant (0.75 à 1.25 M) permet d'induire une résistance partielle à la dénaturation. Finalement, des concentrations supérieures ou égales à 1.5 M permettent d'induire une résistance totale

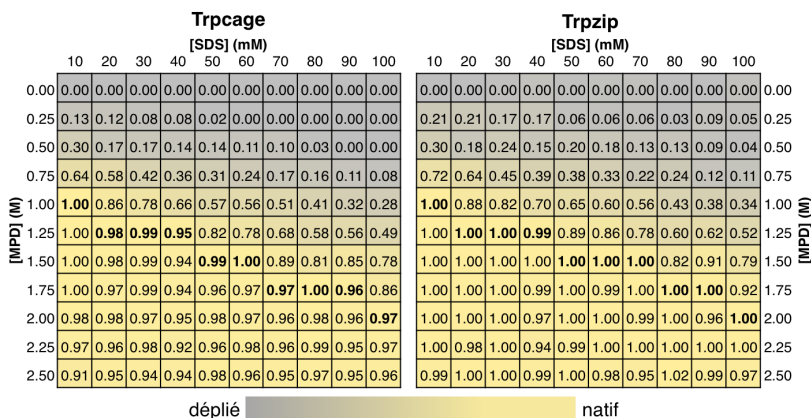


Figure 5.5 – Identification d’un rapport détergent/cosolvant idéal en investigant le repliement des peptides Trpcage (gauche) et Trpzip (droite) en présence de différents rapports SDS/MPD. La fraction native de chaque peptide est calculée à partir des valeurs obtenues en fluorescence intrinsèque. Les valeurs du tableau varient de 0 pour l’échantillon dénaturé ($\lambda_{\max} = 338.5 \pm 0.5$ nm) à 1 lorsque le peptide est replié ($\lambda_{\max} = 350.5 \pm 1.0$ nm).

à la dénaturation puisque les peptides conservent leur structure native respective. Le MPD est en effet connu pour augmenter la stabilité des protéines et maintenir leur conformation native [Huang *et al.*, 2011]. De plus, il a été montré qu’à des concentrations élevées (0.8 à 2.4 M), le MPD est capable d’induire la multimérisation d’une protéine membranaire à partir des monomères natifs extraits en membrane [Tanaka *et al.*, 2011]. De manière remarquable, la concentration en MPD (1.5 M) permettant de résister à la dénaturation par le SDS (60 mM) est identique (i) à celle nécessaire pour induire le repliement de protéines membranaires et solubles [Roussel *et al.*, 2013a, Roussel *et al.*, 2013b, Michaux *et al.*, 2008a, Michaux *et al.*, 2008b] et (ii) à celle nécessaire pour induire la dissociation de la micelle de SDS [Roussel *et al.*, 2014].

5.4.2 Renaturation de peptides dépliés par le SDS

Détermination du rapport SDS/MPD optimal. Dans le but de déterminer le rapport SDS/MPD idéal pour induire le processus de renaturation, les deux peptides ont d’abord été incubés pendant une heure dans des tampons contenant des concentrations croissantes en SDS (de 10 à 100 mM), afin d’induire leur dénaturation (perte de structure tertiaire et maintien de la structure secondaire pour les deux peptides tel que précédemment observé). Le cosolvant est ensuite ajouté (de 0 à 2.5 M) par dilution à chaque échantillon. Les spectres de FI ont été utilisés afin de déterminer une fraction repliée allant de 0 lorsque l’échantillon est déplié dans le SDS ($\lambda_{\max} = 338.5 \pm 0.5$ nm) à 1 lorsqu’il récupère un signal correspondant à une structure native ($\lambda_{\max} =$

351.5±1.0 nm). Ainsi, on observe une tendance commune pour les deux peptides : plus la concentration en SDS est élevée, plus il faut ajouter de MPD dans l'échantillon pour récupérer une structure native (Figure 5.5). En effet, alors qu'en présence de 10 mM SDS, une concentration en MPD de 1.0 M permet d'obtenir une fraction complètement repliée, il faut ajouter environ 2.0 M MPD pour totalement replier les peptides dénaturés dans 100 mM SDS. Contrairement au cas de la protéine membranaire où il fallait une concentration minimale (60 mM) en détergent pour permettre le repliement de l'Omp2a (Figure 2.4), quelle que soit la concentration en SDS, les peptides solubles peuvent être repliés en ajoutant le cosolvant. De manière remarquable, en présence de 60 mM SDS, la concentration en MPD nécessaire pour obtenir l'échantillon natif est identique (1.5 M) à celle observée pour l'Omp2a. Ainsi, les deux peptides solubles s'ajoutent à la liste des protéines solubles (anhydrase carbonique et lysozyme) ou membranaires (PagP, Omp2a) pouvant être dénaturées et repliées en présence d'un rapport très spécifique de SDS (60 mM) et MPD (1.5 M) [Roussel *et al.*, 2013a, Michaux *et al.*, 2008a].

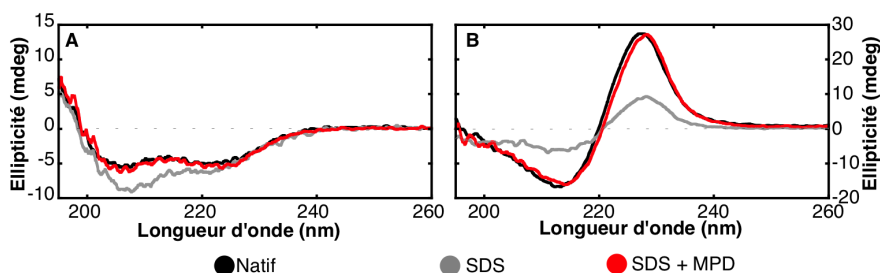


Figure 5.6 – Mise en évidence de la capacité du MPD à induire le repliement des peptides Trpcage (A) et Trpzip (B) par dichroïsme circulaire. Courbe noire = échantillons natifs (sans SDS, ni MPD). Trait gris = échantillons dénaturés dans 60 mM SDS. Spectre rouge = échantillons préalablement dépliés dans le SDS (60 mM) et ensuite repliés en présence de MPD (1.5 M).

Des mesures de DC ont été réalisées à ces concentrations particulières (Figure 5.6). En présence du détergent seul (A, 60 mM, courbe grise), le peptide Trpcage possède un signal correspondant à une hélice α légèrement plus intense que dans la situation native (courbe noire), suite à la capacité du SDS à stabiliser ce type de structure secondaire [Patil *et al.*, 2009, Chamani *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 1996]. L'ajout de MPD (1.5 M) permet d'obtenir un spectre identique à la structure native (courbe rouge). Dans le cas du Trpzip (Figure 5.6, B), le signal DC est dépendant de l'organisation des résidus tryptophanes en excitons et, comme montré précédemment, la présence de la micelle de SDS déstabilise cet arrangement et le signal (ligne grise) est différent de la situation native (ligne noire). Encore une fois, l'ajout du MPD dans le système permet de récupérer un signal identique à la situation native (ligne rouge). Il est intéressant de remarquer que cette méthode originale de repliement est sensible

au point de permettre la réorganisation subtile de ces résidus tryptophanes.

Interactions peptide-SDS-MPD. Afin d’obtenir des informations concernant les interactions entre le peptide, le détergent et le cosolvant, des simulations ont été réalisées. Ainsi, les modèles consistent en une boîte contenant le peptide dénaturé à la surface de la micelle (tel qu’obtenu précédemment) et 1500 molécules de MPD réparties aléatoirement dans le système. Le nombre d’atomes étant très élevés ($\approx 170\,000$), la durée des simulations est limitée à une cinquantaine de nanosecondes (ordre de grandeur de la dissociation de la micelle induite par le MPD), loin du temps nécessaire aux peptides pour se replier qui est de l’ordre de la microseconde [Qiu *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2004]. Ces modèles montrent toutefois que la présence des peptides n’empêche pas la dissociation de la micelle par le MPD (Figure 5.7, **A** et **B**). En effet, le nombre de groupes de SDS augmente (courbe noire) tandis que le nombre d’agrégation diminue (ligne grise) jusqu’à des valeurs (39.9 ± 0.3 et 5.7 ± 0.1 , respectivement) identiques à la situation sans peptide (Figure 5.7, **C** et **D**). On observe qu’en plus d’induire la dissociation de la micelle, le MPD interagit avec les deux peptides puisque le nombre de contacts avec le cosolvant augmente régulièrement (ligne verte) au détriment des contacts avec les molécules d’eau (ligne bleue) et de SDS (rouge) (Figure 5.7, **E** et **F**). Au final, chaque peptide se retrouve dans un environnement majoritairement composé de molécules d’eau et de MPD, bien que quelques molécules de détergent restent à proximité des peptides (**G** et **H**).

La technique de chromatographie d’exclusion a été utilisée afin de mettre en évidence la présence de détergent et/ou cosolvant autour du peptide. Pour des raisons techniques, seules les interactions avec le Trpcage, ont pu être déterminées (Figure 5.8). En effet, les essais sur le Trpzip ont montré que le peptide interagissait avec la matrice de la colonne (Dextran et Dextrose), et n’était donc pas élué dans nos conditions. Ces interactions sont probablement liées à la nature partiellement hydrophobe de ce peptide (quatre résidus tryptophanes exposés en surface), semblable à la situation obtenue en présence de protéines membranaires [Batas *et al.*, 1999].

Pour commencer, le peptide natif (uniquement le tampon phosphate) ou dénaturé (en présence de 8 M urée [Heyda *et al.*, 2011]) a été chargé sur la colonne, permettant de déterminer des volumes d’élution de 15.02 (**A**) et 11.22 mL (**B**), respectivement. L’urée n’étant que faiblement liée aux protéines, [Bennion et Daggett, 2003], la différence de volume d’élution observée n’est due qu’au changement de conformation du peptide. L’ajout de MPD (1.5 M) induit un déplacement du pic d’élution (11.85 mL, **C**) bien que le peptide reste natif, ce qui signifie que le cosolvant se lie au Trpcage (tel qu’observé par DM à la Figure 5.2, **D**) au point d’affecter sa masse moléculaire apparente. Lorsque le peptide est dénaturé par le SDS (60 mM), le volume d’élution diminue pour atteindre une valeur plus basse que l’échantillon déplié dans l’urée (8.46 mL, Figure 5.8, **D**). Le peptide étant lié à la micelle, la masse moléculaire apparente augmente, expliquant la différence de volume d’élution. Finalement, en présence du détergent et du cosolvant, le pic d’élution (13.11 mL, **E**) est loca-

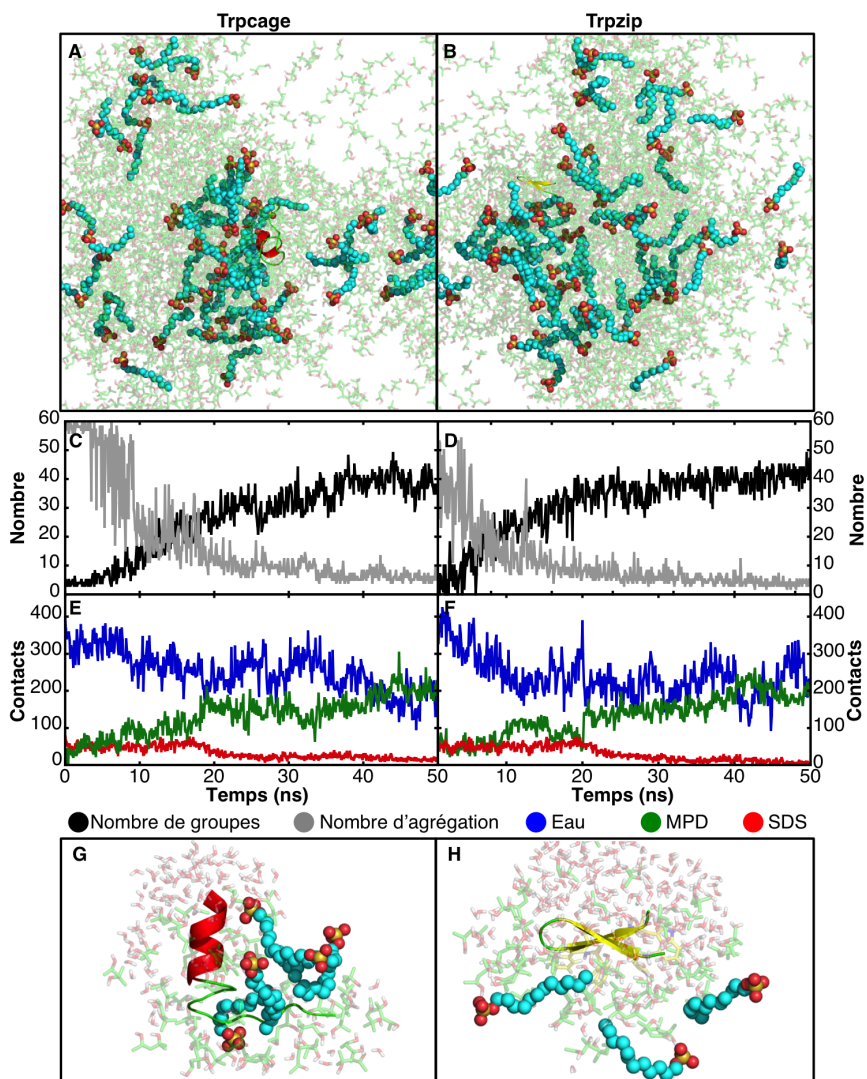


Figure 5.7 – Mise en évidence des interactions peptide - SDS - cosolvant par dynamique moléculaire. (A et B) Situations obtenues en fin de simulations (50 ns). (C et D) Dissociation de la micelle suivie par le nombre de groupes (ligne noire) et d'agrégation (ligne grise). (E et F) Nombre de contacts atomiques ($d < 3.5 \text{ \AA}$) entre le peptide et les molécules d'eau (trait bleu), le SDS (rouge) et le MPD (vert). (G et H) Environnement des peptides en fin de simulations. Seules les molécules situées à moins de 6 Å de la surface des peptides sont représentées afin de faciliter la visualisation.

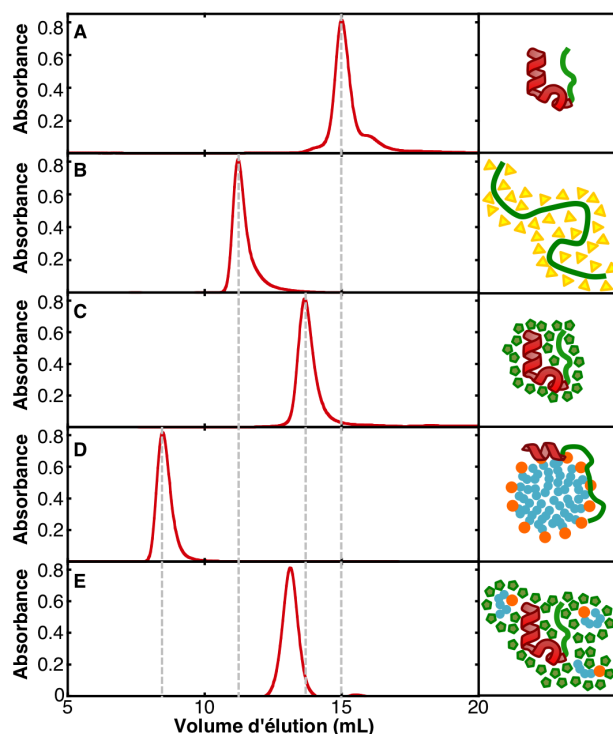


Figure 5.8 – Mise en évidence des interactions peptide - SDS - cosolvant par chromatographie d'exclusion. Le volume d'élution du peptide TrpCage est obtenu dans différents tampon : (A) 20 mM Tampon phosphate pH 7.4 (natif), (B) 8 M urée (dénaturé), (C) 1.5 M MPD (natif), (D) 60 mM SDS (partiellement dénaturé) et (E) 60 mM SDS + 1.5 M MPD (natif).

lisé à un volume situé entre le peptide en présence du MPD seul, et le peptide déplié à la surface de la micelle. Cette observation permet donc de confirmer que le peptide se retrouve entouré par un mélange de MPD et de SDS. En effet, bien que le MPD interagisse avec les molécules de SDS au point d'induire la dissociation de la micelle, certaines molécules de détergent restent liées au peptide qui récupère néanmoins sa structure native telle qu'observée par DC (Figure 5.6, A). Le pic étant plus proche de celui correspondant à la situation en présence du MPD seul, la quantité de molécules de détergent encore liées au peptide semble fort réduite, tel qu'observé par les modèles théoriques.

5.4.3 Nature du cosolvant

Analogues structurellement proches du MPD. Dans le but de déterminer quels groupements chimiques du MPD sont essentiels pour inverser les propriétés dénaturantes du SDS, des essais de repliement de deux peptides ont

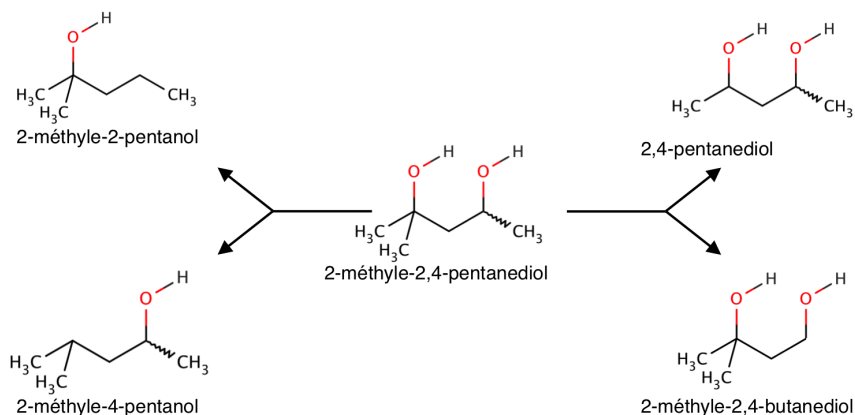


Figure 5.9 – Sélection de cosolvants structurellement proches du MPD (centre). Les analogues de gauche possèdent un groupement hydroxyles de moins tandis que ceux de droite sont réduits d'un groupement méthyles.

été réalisés en présence de cosolvants dont la structure est proche de celle du MPD (Figure 5.9). Ces alcools possèdent soit une fonction hydroxyle en moins (2-méthyle-2-pentanol et 2-méthyle-4-pentanol), soit un groupement méthyle manquant (2,4-pentanediol, 2-méthyle-2,4-butanediol). A partir de mesures de fluorescence intrinsèque, il a été possible de déterminer la fraction native de chaque peptide en présence de SDS et des différents cosolvants (Figure 5.10). Quel que soit le peptide, cette valeur passe de 0.98 ± 0.02 dans le tampon natif (20 mM tampon phosphate) à 0.02 ± 0.02 en présence de SDS (60 mM). Comme précédemment montré, le MPD (1.5 M) permet d'induire le repliement de chaque peptide puisque la fraction native obtenue est de 0.97 ± 0.02 . Le retrait d'un groupement méthyle ne semble pas jouer un rôle majeur dans la capacité du cosolvant à induire la renaturation. En effet, en présence de 2,4-pentanediol ou de 2-méthyle-2,4-butanediol (1.5 M), les deux peptides sont repliés bien que les fractions natives soient inférieures à celles obtenues en présence du MPD (> 0.85 et 0.70 , respectivement). De manière surprenante, l'absence de la fonction hydroxyle en position 4 a un effet différent en fonction du peptide. En effet, alors que le Trpcage sera complètement replié en présence de 2-méthyle-2-pentanol (0.91 ± 0.06), le Trpzip n'est que partiellement renaturé (0.51 ± 0.07). Finalement, le groupement hydroxyle situé en position 2 semble jouer un rôle essentiel puisque son absence se manifeste par l'incapacité du cosolvant (2-méthyle-4-pentanol) à inverser les propriétés dénaturantes du SDS et les deux peptides restent complètement dépliés (fraction native < 0.1).

Renaturation en présence de différents alcools. La capacité d'autres alcools (1.5 M) à induire le repliement des peptides dénaturés par le SDS (60 mM) a également été étudiée à l'aide de la fluorescence intrinsèque (Figure 5.11, **A**). Excepté le 2-méthyle-2-pentanol, les cosolvants semblent avoir la même influence sur le repliement des deux peptides puisque les valeurs des fractions natives sont toujours proches, suggérant un mécanisme qui n'est pas dépendant

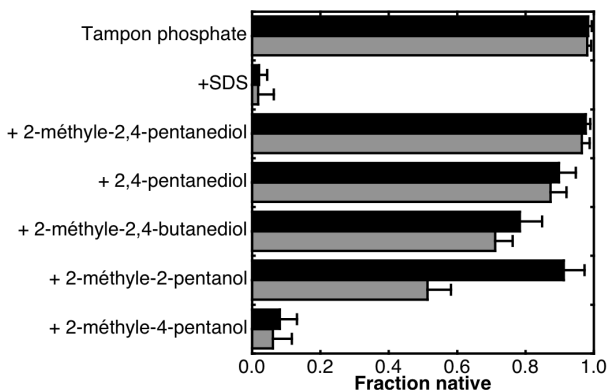


Figure 5.10 – Mise en évidence de la renaturation du peptide Trpcage (noir) et Trpzip (gris) en présence de cosolvants structuellement proches du MPD. La fraction native déterminée par fluorescence intrinsèque varie de 0 pour l'échantillon dénaturé ($\lambda_{\max} = 338.5 \pm 0.5$ nm) à 1 lorsque le peptide est replié ($\lambda_{\max} = 350.5 \pm 1.0$ nm). Les barres d'erreur associées correspondent à trois échantillons indépendants.

de la séquence peptidique (et donc de la structure secondaire). La moitié des alcools testés sont capables d'induire le repliement des peptides solubles et correspondent globalement à ceux permettant le repliement de l'Omp2a (Figure 2.8) et de PagP [Michaux *et al.*, 2008a]. Pour permettre la renaturation à partir d'échantillons dénaturés dans le SDS, le cosolvant doit être capable d'interagir avec le peptide afin de minimiser les interactions avec le SDS comme montré par chromatographie d'exclusion. De plus, l'étude du mécanisme de dissociation de la micelle induit par le MPD a montré que le cosolvant interagit avec la molécule de SDS en formant des ponts hydrogènes avec le groupement sulfate de la tête polaire et en recouvrant la chaîne apolaire [Roussel *et al.*, 2014]. Ces trois paramètres ont été quantifiés pour chaque alcool par dynamique moléculaire : (i) En modélisant une boîte contenant le peptide et 25 molécules de cosolvant, il a été possible de déterminer un nombre de contacts atomiques entre les deux partenaires (Figure 5.11, **B**). (ii) Le nombre de ponts hydrogènes entre le SDS et l'alcool a été obtenu en modélisant une boîte contenant une molécule de détergent et 25 molécules de cosolvant (**C**). (iii) Finalement, la capacité de chaque alcool à couvrir la chaîne apolaire du SDS est obtenue en calculant le nombre de contacts atomiques entre les deux partenaires (**D**). À partir de ces informations, on remarque que les alcools capables d'induire le repliement des peptides sont tous (excepté le 1-pentanol) capables d'interagir avec le peptide (nombre de contacts élevés) et les molécules de SDS (ponts hydrogènes avec le groupement sulfate et couverture de la chaîne alkyle). Les alcools qui n'inversent pas les propriétés dénaturantes du SDS ne satisfont pas au moins l'un des trois critères. Par exemple, le méthanol qui ne se lie pas aux peptides, ne réalise pas de ponts hydrogènes avec le détergent et ne couvre pas sa partie alkyle, n'est pas capable d'induire le repliement des peptides. Un autre exemple

est le 1,3-butanediol, qui n'est pas capable de couvrir la surface de la protéine ni la chaîne alkyle du détergent mais qui peut réaliser des liaisons hydrogènes avec le groupement polaire du détergent, n'induit quand même pas le repliement des peptides.

5.5 Conclusions

Au cours de ce chapitre, il a d'abord été montré que le MPD peut induire une résistance à la dénaturation par le détergent. En effet, les résultats de FI montrent qu'à partir d'une certaine concentration en MPD (1.5 M), les peptides Trpcage et Trpzip conservent leur structure native malgré l'ajout de SDS (60 mM). Les simulations montrent que le MPD recouvre la surface du peptide, empêchant ainsi les interactions avec le SDS et donc la dénaturation. Il a ensuite été montré qu'en présence du cosolvant, les peptides préalablement dépliés par le SDS peuvent être repliés. A partir d'échantillons dénaturés dans différentes concentrations en SDS, l'ajout de MPD en concentrations molaires a permis de récupérer la structure native des deux peptides. De manière intéressante, en présence de 60 mM SDS (la concentration en détergent nécessaire pour solubiliser les protéines membranaires), une concentration en cosolvant de 1.5 M est nécessaire pour inverser les propriétés dénaturantes du SDS et permettre le retour à une structure native des peptides. Ce rapport (60 mM SDS et 1.5 M MPD) est identique à celui permettant le repliement de protéines complexes solubles et membranaires, suggérant un mécanisme universel. Les simulations montrent que, comme précédemment démontré, le MPD induit la dissociation de la micelle et remplace partiellement les molécules de SDS liées à la surface de la protéine. Au final, les peptides se retrouvent dans un environnement composé d'une majorité de molécules de cosolvant et de quelques molécules de SDS, permettant leur repliement.

L'utilisation de molécules structurellement proches du MPD a permis de montrer l'importance des groupements hydroxyles dans le mécanisme de repliement. En effet, l'absence d'une de ces fonctions altère la capacité du cosolvant à inverser les propriétés dénaturantes du SDS, et les peptides ne sont que partiellement repliés. Finalement, en ajoutant certains alcools à des échantillons préalablement dénaturés dans le SDS, il a été possible d'identifier d'autres cosolvants pouvant induire le repliement des peptides. Ceux-ci semblent avoir comme propriétés d'être capable d'interagir étroitement avec les peptides, de former des liaisons hydrogènes avec les groupements sulfates des molécules de SDS (expliquant l'importance des groupements hydroxyles) et de couvrir la chaîne apolaire du détergent afin d'induire la dissociation de la micelle.

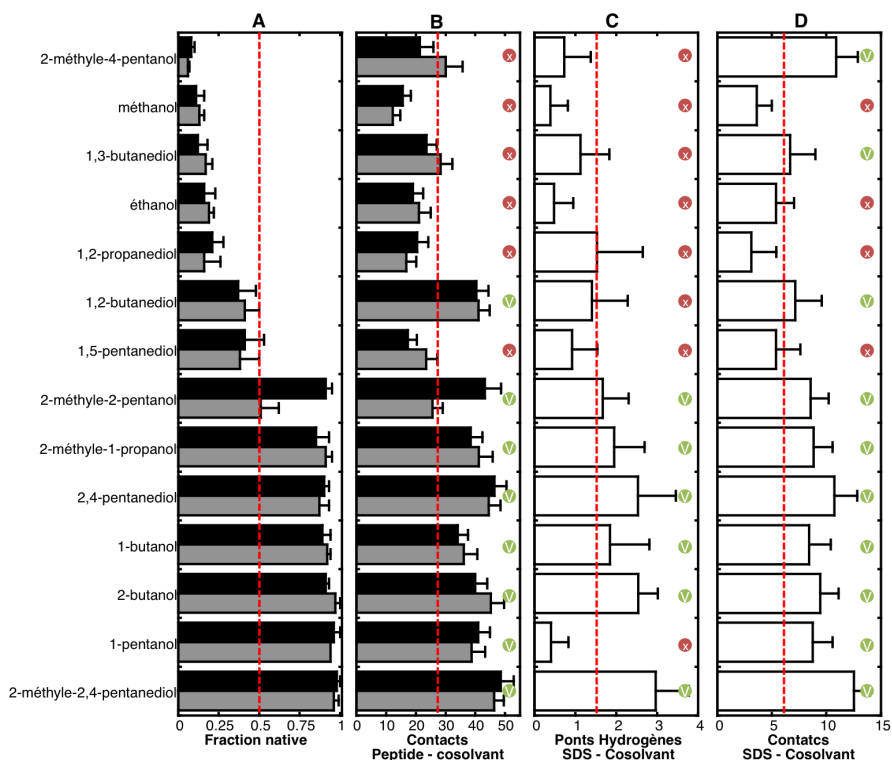


Figure 5.11 – Renaturation du peptide Trpcage (noir) et Trpzip (gris) en présence de différents alcools. (A) La fraction native obtenue pour chaque cosolvant varie de 0 pour l'échantillon dénaturé ($\lambda_{\max} = 338.5 \pm 0.5$ nm) à 1 lorsque le peptide est replié ($\lambda_{\max} = 350.5 \pm 1.0$ nm). (B) Nombre de contacts atomiques ($d < 3.5$ Å) entre le cosolvant et le peptide. (C) Nombre de ponts hydrogènes entre la tête polaire du SDS et le cosolvant. (D) Nombre de contacts atomiques entre la chaîne apolaire du SDS et le cosolvant. Les lignes discontinues rouges correspondent à la moitié de la valeur maximale de chaque paramètre.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions. L'objectif général de cette thèse était d'appliquer et de comprendre une méthode originale de repliement de protéines combinant le sodium dodécyle sulfate (SDS), un détergent anionique dénaturant, au 2-méthyle-2,4-pentanediol (MPD), un cosolvant connu pour ses propriétés stabilisantes.

Une première partie du travail a été d'appliquer cette méthode originale afin d'étudier le repliement d'une protéine membranaire multimérique exprimée sous forme de corps d'inclusion solubilisés dans un tampon contenant une concentration élevée (8 M) en urée (Figure 6.1, **A**). Habituellement, la méthode classique consiste à réduire la concentration en agent dénaturant en diluant les échantillons dans un tampon contenant un détergent. Celui-ci permet de maintenir la protéine soluble et, dans certains cas, d'induire son repliement. La technique est contraignante car elle demande de cribler de nombreux tampons contenant différents détergents dans différentes conditions (pH, concentrations, force ionique, ...). En appliquant la méthode combinant le SDS et le MPD, il a d'abord été possible de remplacer l'urée par le SDS (60 mM) et de maintenir les protéines solubles (**B**). L'ajout de MPD dans le système a ensuite permis d'in-

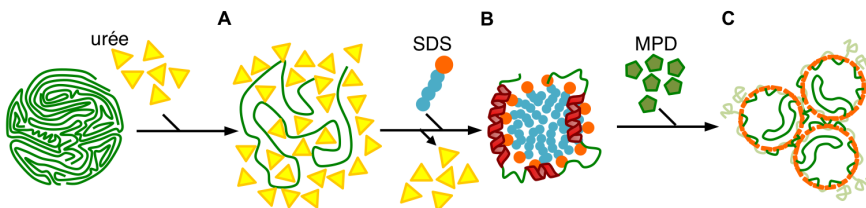


Figure 6.1 – Chapitre 2 : Repliement de l'Omp2a de *Brucella melitensis* à partir de corps d'inclusion par la méthode associant le SDS au MPD.

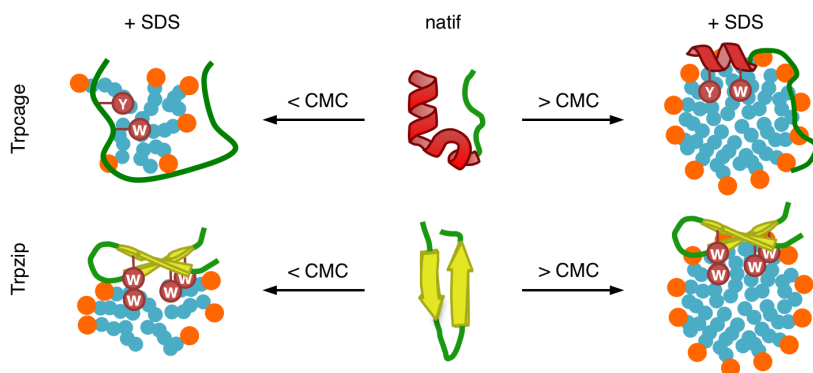


Figure 6.2 – Chapitre 3 : Dénaturation de peptides solubles par le SDS. Que la concentration en SDS soit inférieure (partie de gauche) ou supérieure (partie de droite) à la CMC, les résidus aromatiques constituent un site d'interaction privilégié avec le détergent.

duire le repliement de l'Omp2a et de récupérer une structure native trimérique en tonneaux β (C). A partir de différentes combinaisons détergent/cosolvant, il a été possible de déterminer le rapport idéal permettant de replier la protéine membranaire, à savoir 60 mM SDS et 1.5 M MPD.

Afin de comprendre comment le MPD inverse les propriétés dénaturantes du SDS et d'identifier les interactions spécifiques entre les différents intervenants (protéine/SDS/MPD), le système a été simplifié en utilisant des peptides solubles représentant les deux catégories principales de structures secondaires : le peptide trpcage possédant une hélice α et le Trpzp ayant une structure en feuillet β . L'utilisation de ces peptides modèles nous a permis de combiner des mesures expérimentales afin d'obtenir des informations concernant la structure des peptides (fluorescence intrinsèque, dichroïsme circulaire, diffusion lumineuse et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) à des simulations (dynamique moléculaire) qui permettent de mettre en évidence les interactions atomiques entre les différents partenaires.

La stabilité des peptides en présence du détergent a d'abord été étudiée. Ainsi, en solubilisant les peptides en présence de concentrations croissantes en SDS, deux régions ont été identifiées (Figure 6.2) : (i) une région où le détergent existe exclusivement sous une forme monomérique (en dessous de la CMC) qui interagit avec les peptides et induisant la dénaturation complète du Trpcage alors que le Trpzp reste natif. Le SDS interagit principalement avec les régions hydrophobes du peptide cherchant à minimiser les contacts entre sa chaîne apolaire et les molécules d'eau du solvant. La charge négative portée par la tête polaire du SDS joue également un rôle important dans les interactions avec le peptide et serait responsable de la dénaturation suite à un mécanisme de répulsion entre les différentes molécules de détergent liées au peptide. (ii) une région où le détergent existe sous la forme de micelles. Les deux peptides sont

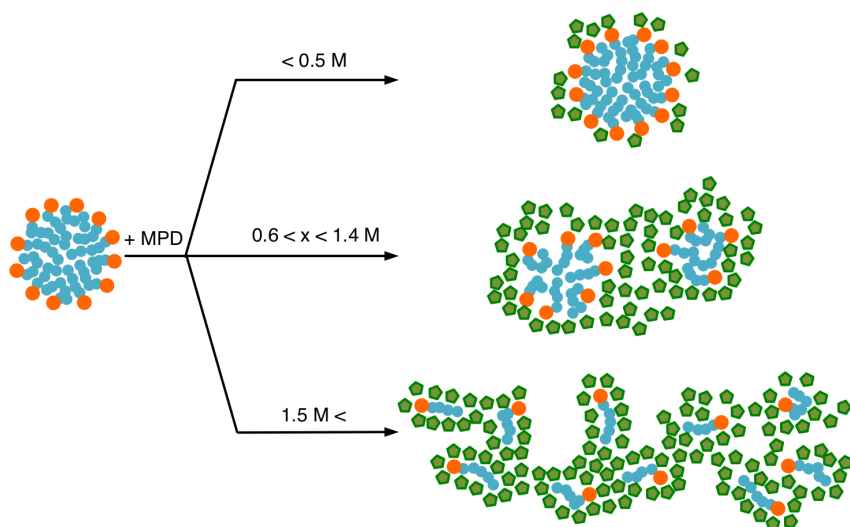


Figure 6.3 – Chapitre 3 : Dissociation de la micelle de SDS induite par le MPD.

partiellement dénaturés à l'interface entre la région polaire (solvant et groupements sulfates) et apolaire (chaines alkyles du SDS) de la micelle. Ainsi les résidus hydrophobes du peptide sont ancrés à l'intérieur de la micelle, tandis que les résidus hydrophiles restent en surface. Les contacts entre les peptides et le SDS sont plus nombreux et moins spécifiques que lorsque le SDS est sous une forme monomérique.

L'effet du MPD sur des micelles de SDS a ensuite été mis en évidence (Figure 6.3) en combinant les résultats expérimentaux (diffusion lumineuse) et théoriques (simulations gros grains). Il a ainsi été montré que le cosolvant affecte la stabilité de la micelle et trois régions ont été identifiées : (i) en dessous d'une concentration de 0.5 M, la forme de la micelle (et donc ses dimensions) est légèrement affectée par la présence des molécules de MPD en surface. (ii) entre 0.6 et 1.4 M MPD, la concentration en alcool est suffisante que pour induire la dissociation de la micelle qui est optimale en présence de 1.5 M MPD (iii). Cette dernière concentration est identique à celle nécessaire pour replier les protéines dénaturées par le SDS (60 mM), ce qui suggère un lien entre la dissociation de la micelle et le processus de renaturation. Les interactions spécifiques entre le détergent et le cosolvant ont été identifiées à l'aide d'un modèle atomistique qui montre que les fonctions hydroxyles du MPD forment des ponts hydrogènes avec le groupement sulfate du détergent, tandis que la partie alkyle du cosolvant peut couvrir la chaîne apolaire du détergent permettant la dissociation de la micelle.

Les trois partenaires (peptide - SDS - MPD) ont ensuite été combinés afin de comprendre comment le cosolvant peut interférer avec la dénaturation de pep-

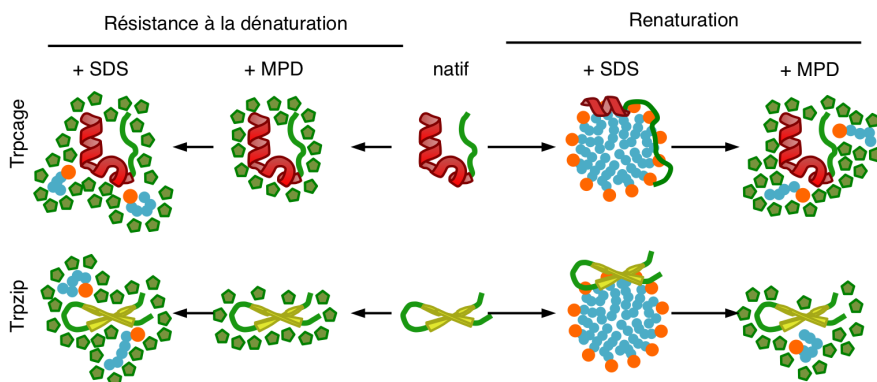


Figure 6.4 – Chapitre 4 : Rôle du MPD dans la résistance à la dénaturation et le repliement de peptides dépliés dans le SDS.

tides et permettre leur repliement. La capacité du MPD à induire une résistance à la dénaturation a d'abord été mise en évidence. Ainsi, en solubilisant les peptides dans un tampon contenant le cosolvant, les peptides conservent leur structure native respective malgré l'ajout de SDS (Figure 6.4, partie de gauche). Les résultats de chromatographie d'exclusion et des simulations montrent que le MPD interagit avec la surface des peptides empêchant ainsi le SDS d'y accéder et d'induire leur dépliement. Lorsque les peptides sont préalablement dépliés en présence de concentrations en SDS supérieures à la CMC, l'ajout de MPD induit également la dissociation de la micelle et remplace les molécules de SDS à la surface du peptide permettant un retour à une structure native (Figure 6.4, partie de droite). Qu'il s'agisse de résistance à la dénaturation ou de repliement, le peptide se retrouve dans un environnement similaire composés majoritairement des molécules de cosolvant et de quelques molécules de SDS résiduelles. Ces dernières jouent certainement un rôle essentiel dans le repliement des protéines membranaires puisque celles-ci sont incapables de se replier en présence du cosolvant seul. De manière intéressante, la concentration optimale en MPD (1.5 M) nécessaire pour récupérer la structure native des peptides solubles est identique à celle permettant le repliement de la protéine membranaire multimérique en tonneaux β , suggérant un mécanisme commun aux deux catégories de protéines.

Finalement, différentes combinaisons SDS-alcool ont été envisagées afin d'identifier les caractéristiques essentielles d'un cosolvant nécessaires pour inverser les propriétés dénaturantes du SDS et permettre le repliement de protéines. En effet, le cosolvant doit être capable (i) de couvrir la surface de la protéine afin de protéger la protéine de l'action du SDS, (ii) former des ponts hydrogènes avec le groupement sulfate du détergent afin de réduire l'influence de la charge négative et (iii) de protéger la chaîne apolaire du SDS afin de favoriser la dissociation de la micelle.

Perspectives à court terme. Ce travail s'inscrit dans un projet global de mise au point d'une méthode originale universelle de repliement de protéines (solubles ou membranaires). De nombreuses études restent donc nécessaires afin de comprendre comment un cosolvant peut inverser les propriétés dénaturantes du SDS et de proposer un protocole applicable à tout type de protéine.

Premièrement, il serait intéressant d'étendre l'étude des couples détergent-alcool afin de sélectionner un maximum de candidats capables d'induire le repliement des peptides solubles.

Deuxièmement, la méthode pourrait être appliquée à l'étude de peptides membranaires. Cette étape permettrait de conserver un système relativement simple tout en abordant la complexité de cas membranaires. Différents cibles pourraient être envisagées telles que les peptides de la famille WALP (peptides membranaires en hélices α de différentes longueurs [de Jesus et Allen, 2013, Rankenberg *et al.*, 2012, Holt *et al.*, 2009]) et WLN (peptides transmembranaires en feuillets β [Holt et Killian, 2010, Bond *et al.*, 2008, Bond *et al.*, 2007]). L'étude de ces peptides permettrait d'appliquer les couples candidats identifiés à l'étape précédente et de restreindre la sélection à ceux qui sont également capables de replier les peptides membranaires. De plus, la classe des protéines membranaires en hélices α est la seule dont aucune protéine n'a pu être repliée, actuellement, par notre méthode. Il serait donc intéressant d'identifier les couples SDS/cosolvant capables de replier cette classe de protéine.

Finalement, afin de valider la méthode sur de plus gros systèmes, il serait intéressant d'appliquer les différents couples détergent/cosolvant sur des protéines membranaires modèles. Ainsi, l'utilisation de l'EmrE (protéine membranaire modèle des structures en hélices α [Bay *et al.*, 2010, Miller *et al.*, 2009]) et de l'OmpA (protéine transmembranaire modèle des tonneaux β [Johansson *et al.*, 2007, Surrey et Jähnig, 1995]) dont les structures et les voies de repliement respectives sont connues permettrait de comparer les structures obtenues à l'aide notre méthode avec les méthodes classiques et d'identifier le ou les couple(s) SDS/cosolvant idéaux.

Perspectives à long terme. A l'heure de la protéomique, de plus en plus de nouvelles cibles sont identifiées telles que des protéines impliquées dans des processus biologiques d'intérêt ou responsables de différentes pathologies. Dans les deux cas, l'accès à une grande quantité de protéine native reste une source d'informations particulièrement intéressante permettant de pouvoir étudier *in vitro* les fonctions de la protéine d'intérêt et d'éventuellement décrire sa structure tridimensionnelle permettant comprendre en profondeur les mécanismes associés ou d'identifier de nouvelles molécules thérapeutiques. Malheureusement, la surexpression de protéines dans un organisme hôte résulte généralement en la formation de corps d'inclusion qui sont, encore aujourd'hui, difficilement exploitables [Basu *et al.*, 2011, Burgess, 2009] puisqu'il est difficile de solubiliser les protéines tout en évitant l'agrégation [Singh et Panda, 2005] et qu'il faut éventuellement trouver les conditions optimales permettant de récupérer une structure native [Burgess, 2009, Canaan *et al.*, 2004, Vallejo et

Rinas, 2004]. Dans ce contexte, le développement de la méthode originale de repliement de protéines associant le SDS (capable de solubiliser les protéines de manière presque universelle [Tulumello et Deber, 2009, Tulumello et Deber, 2012, Watarai *et al.*, 2000]) à un cosolvant pourrait permettre de proposer un/des outil(s) adapté(s) à différentes classes de protéines. Un exemple concret pourrait être l'étude des récepteurs membranaires couplés à des protéines G (GPCR; "G-coupled protein receptor"). En effet, bien que cette catégorie de protéines à 7 hélices transmembranaires représente environ 50% des cibles thérapeutiques [Jimonet et Jager, 2004, Guo *et al.*, 2014], seules 18 structures uniques ont pu être déterminées actuellement (Membrane protein data bank; chiffre 2013). La compréhension des mécanismes liés au fonctionnement de ces protéines reste donc actuellement limitée [Lacapère *et al.*, 2007] et la transférabilité de notre méthode sur cette seule classe de protéines seraient donc un énorme pas en avant.

D'une manière générale et malgré l'importance fondamentale de comprendre comment une protéine se replie, le mécanisme de renaturation est encore très peu connu [Bowie, 2005, Dill *et al.*, 2007]. Diverses raisons sont avancées dont l'hétérogénéité des méthodes de repliement des protéines [Dill *et al.*, 2008]. En effet, le processus de renaturation d'une protéine sera probablement différent selon qu'il soit induit en retirant un agent dénaturant, en ajoutant un détergent, des petites molécules organiques (acides aminés) ou en refroidissant graduellement un échantillon préalablement chauffé. L'utilisation de la méthode associant le SDS au MPD permettrait donc de pouvoir déplier et replier différentes protéines dans des conditions semblables permettant ainsi de pouvoir comparer les résultats obtenus et d'éventuellement pouvoir identifier des schémas de repliement communs.

Bibliographie

- [Akhter, 1999] AKHTER, M. (1999). Effect of solubilization of alcohols on critical micelle concentration of non-aqueous micellar solutions. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 157(1-3):203–210.
- [Anand et al., 2002] ANAND, K., PAL, D. et HILGENFELD, R. (2002). An overview on 2-methyl-2,4-pentanediol in crystallization and in crystals of biological macromolecules. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58:1722–1728.
- [Andersen et al., 2009] ANDERSEN, K. K., OLIVEIRA, C. L., LARSEN, K. L., POULSEN, F. M., CALLISEN, T. H., WESTH, P., PEDERSEN, J. S. et OTZEN, D. (2009). The role of decorated SDS micelles in sub-CMC protein denaturation and association. *Journal of molecular biology*, 391(1):207–26.
- [Bannwarth et Schulz, 2003] BANNWARTH, M. et SCHULZ, G. E. (2003). The expression of outer membrane proteins for crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610(1):37–45.
- [Barrera et al., 2005] BARRERA, F. N., RENART, M. L., MOLINA, M. L., POVEDA, J. a., ENCINAR, J. a., FERNÁNDEZ, A. M., NEIRA, J. L. et GONZÁLEZ-ROS, J. M. (2005). Unfolding and refolding in vitro of a tetrameric, alpha-helical membrane protein : the prokaryotic potassium channel KcsA. *Biochemistry*, 44(43):14344–52.
- [Basu et al., 2011] BASU, A., LI, X. et LEONG, S. S. J. (2011). Refolding of proteins from inclusion bodies : rational design and recipes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(2):241–51.
- [Batas et al., 1999] BATAS, B., SCHIRALDI, C. et CHAUDHURI, J. B. (1999). Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography. *Journal of biotechnology*, 68(2-3):149–58.
- [Bay et al., 2010] BAY, D. C., BUDIMAN, R. A., NIEH, M.-P. et TURNER, R. J. (2010). Multimeric forms of the small multidrug resistance protein EmrE in anionic detergent. *Biochimica et biophysica acta*, 1798(3):526–35.

- [Bednarska *et al.*, 2013] BEDNARSKA, N. G., SCHYMKOWITZ, J., ROUSSEAU, F. et VAN ELDERE, J. (2013). Protein aggregation in bacteria : the thin boundary between functionality and toxicity. *Microbiology*, 159(9):1795–806.
- [Bello *et al.*, 2012] BELLO, M., GUTIÉRREZ, G. et GARCÍA-HERNÁNDEZ, E. (2012). Structure and dynamics of β -lactoglobulin in complex with dodecyl sulfate and laurate : a molecular dynamics study. *Biophysical chemistry*, 165-166:79–86.
- [Bennion et Daggett, 2003] BENNION, B. J. et DAGGETT, V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9):5142–7.
- [Berendsen *et al.*, 1984] BERENDSEN, H. J. C., POSTMA, J. P. M., VAN GUNSTEREN, W. F., DI NOLA, A. et HAAK, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8):3684 – 3690.
- [Bhuyan, 2010] BHUYAN, A. (2010). On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers*, 93(2):186–99.
- [Bolkhus *et al.*, 2004] BOLKHUS, A. M., HOILAND, H. et GILJE, E. (2004). The effect of inorganic salt on the solubilization of alcohols in aqueous surfactant solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, (12):125–129.
- [Bond *et al.*, 2007] BOND, P. J., HOLYOAKE, J., IVETAC, A., KHALID, S. et SANSOM, M. S. P. (2007). Coarse-grained molecular dynamics simulations of membrane proteins and peptides. *Journal of structural biology*, 157(3):593–605.
- [Bond *et al.*, 2008] BOND, P. J., PARTON, D. L., CLARK, J. F. et SANSOM, M. S. P. (2008). Coarse-grained simulations of the membrane-active antimicrobial Peptide maculatin 1.1. *Biophysical journal*, 95(8):3802–15.
- [Booth, 2003] BOOTH, P. J. (2003). The trials and tribulations of membrane protein folding in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610(1):51–56.
- [Bowie, 2005] BOWIE, J. U. (2005). Solving the membrane protein folding problem. *Nature*, 438(7068):581–9.
- [Bruce *et al.*, 2002a] BRUCE, C. D., BERKOWITZ, M. L., PERERA, L. et FORBES, M. D. E. (2002a). Molecular dynamics simulation of sodium dodecyl sulfate micelle in water : micellar structural characteristics and counterion distribution. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:3788–3793.
- [Bruce *et al.*, 2002b] BRUCE, C. D., SENAPATI, S., BERKOWITZ, M. L., PERERA, L. et FORBES, M. D. E. (2002b). Molecular dynamics simulations of sodium dodecyl sulfate micelle in water : the behavior of water. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:10902–10907.
- [Bunagan *et al.*, 2006] BUNAGAN, M. R., YANG, X., SAVEN, J. G. et GAI, F. (2006). Ultrafast folding of a computationally designed Trp-cage mutant : Trp2-cage. *The journal of physical chemistry. B*, 110(8):3759–63.

- [Burgess *et al.*, 2008] BURGESS, N. K., DAO, T. P., STANLEY, A. M. et FLEMING, K. G. (2008). Beta-barrel proteins that reside in the Escherichia coli outer membrane in vivo demonstrate varied folding behavior in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 283(39):26748–26758.
- [Burgess, 2009] BURGESS, R. R. (2009). Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods in Enzymology*, 463:259–282.
- [Canaan *et al.*, 2004] CANAAN, P., VINCENTELLI, R., VALENCIA, C., MAURIN, D., FRASSINETTI, F., SCAPPUCINI-CALVO, N. A., BOURNE, Y. et CAMBILLAU, C. (2004). High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Science*, 13:2782–2792.
- [Candau *et al.*, 1982] CANDAU, S., HIRSCH, E. et ZANA, R. (1982). Effect of alcohol on the properties of micellar systems : IV. Effect of the isotopic composition of the system on the micellar properties in the presence and absence of 1-pentanol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 88(2):428–436.
- [Candotti *et al.*, 2013] CANDOTTI, M., ESTEBAN-MARTÍN, S., SALVATELLA, X. et OROZCO, M. (2013). Toward an atomistic description of the urea-denatured state of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15):5933–8.
- [Chamani *et al.*, 2006] CHAMANI, J., MOOSAVI-MOVAHEDI, a. a., RAJABI, O., GHARANFOLI, M., MOMEN-HERAVI, M., HAKIMELAHI, G. H., NEAMATI-BAGHSIAH, a. et VARASTEH, a. R. (2006). Cooperative alpha-helix formation of beta-lactoglobulin induced by sodium n-alkyl sulfates. *Journal of colloid and interface science*, 293(1):52–60.
- [Chen *et al.*, 1986] CHEN, J.-M., SU, T.-M. et MOU, C. Y. (1986). Size of sodium dodecyl sulfate micelle in concentrated salt solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, 12:2418–2421.
- [Chuang *et al.*, 2011] CHUANG, J.-H., KAO, Y.-J., RUDERMAN, N. B., TUNG, L.-C. et LIN, Y. (2011). Optimal concentrations of N-decanoyl-N-methylglucamine and sodium dodecyl sulfate allow the extraction and analysis of membrane proteins. *Analytical biochemistry*, 418(2):298–300.
- [Clark, 1998] CLARK, E. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 9:157–163.
- [Cochran *et al.*, 2001] COCHRAN, A. G., SKELTON, N. J. et STAROVASNIK, M. A. (2001). Tryptophan zippers : stable, monomeric beta-hairpins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10):5578–83.
- [Collins, 2007] COLLINS, T. (2007). ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 43(S1):S25–S30.
- [Cregg *et al.*, 2009] CREGG, J. M., TOLSTORUKOV, I., KUSARI, A., SUNGA, J., MADDEN, K. et CHAPPELL, T. (2009). *Expression in the yeast Pichia pastoris*, volume 463. Elsevier Inc., 1 édition.
- [Cuesta-Seijo *et al.*, 2010] CUESTA-SEIJO, J. A., NEALE, C., KHAN, M. A., MOKTAR, J., TRAN, C., BISHOP, R. E., POMÈS, R. et PRIVÉ, G. G. (2010).

- PagP crystallized from SDS / cosolvent reveals the route for phospholipid access to the hydrocarbon ruler. *Structure*, 18(9):1210–1219.
- [Daura *et al.*, 1998] DAURA, X., MARK, A. E. et VAN GUNSTEREN, W. (1998). Parametrization of Aliphatic CH_n United Atoms of GROMOS96 Force Field. *Journal of Computational Chemistry*, 19(5):535–547.
- [Day et Daggett, 2003] DAY, R. et DAGGETT, V. (2003). All-atom simulations of protein folding and unfolding. *Advances in protein chemistry*, 66:373–403.
- [Day *et al.*, 2010] DAY, R., PASCHEK, D. et GARCIA, A. E. (2010). Microsecond simulations of the folding/unfolding thermodynamics of the Trp-cage miniprotein. *Proteins*, 78(8):1889–99.
- [De Bernardez Clark *et al.*, 1999] DE BERNARDEZ CLARK, E., SCHWARZ, E. et RUDOLPH, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods in Enzymology*, 309:217–36.
- [de Jesus et Allen, 2013] de JESUS, A. J. et ALLEN, T. W. (2013). The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(2):864–76.
- [de Marco, 2007a] de MARCO, A. (2007a). Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in e. coli. *BMC Biotechnology*, 12:7–32.
- [de Marco, 2007b] de MARCO, A. (2007b). Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperons in escherichia coli. *Nature Protocols*, 2:2632–2639.
- [de Marco *et al.*, 2005] de MARCO, A., VIGH, L., DIAMANT, S. et GOLOUBI-NOFF, P. (2005). Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in escherichia coli by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell stress chaperones*, 10:329)339.
- [Debnath *et al.*, 2010] DEBNATH, D., NIELSEN, K. L. et OTZEN, D. E. (2010). In vitro association of fragments of a beta-sheet membrane protein. *Biophysical chemistry*, 148(1-3):112–20.
- [Demarest *et al.*, 2001] DEMAREST, S., HORNG, J. et RALEIGH, D. (2001). A protein dissection study demonstrates that two specific hydrophobic clusters play a key role in stabilizing the core structure of the molten globule state of human alpha-lactoglobulin. *Proteins*, 42:237–242.
- [Dempsey *et al.*, 2005] DEMPSEY, C. E., PIGGOT, T. J. et MASON, P. E. (2005). Dissecting contributions to the denaturant sensitivities of proteins. *Biochemistry*, 44(2):775–81.
- [Dill, 1990] DILL, K. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29:7133–7155.
- [Dill *et al.*, 2008] DILL, K. A., OZKAN, S. B., SHELL, M. S. et WEIKL, T. R. (2008). The protein folding problem. *Annual review of biophysics*, 37:289–316.
- [Dill *et al.*, 2007] DILL, K. A., OZKAN, S. B., WEIKL, T. R., CHODERA, J. D. et VOELZ, V. A. (2007). The protein folding problem : when will it be solved ? *Current opinion in structural biology*, 17(3):342–6.

- [Domínguez, 2011] DOMÍNGUEZ, H. (2011). Structural transition of the sodium dodecyl sulfate (SDS) surfactant induced by changes in surfactant concentrations. *The journal of physical chemistry. B*, 115(43):12422–8.
- [Dutta *et al.*, 2010a] DUTTA, A., KIM, T.-Y., MOELLER, M., WU, J., ALEXIEV, U. et KLEIN-SEETHARAMAN, J. (2010a). Characterization of membrane protein non-native states. 2. The SDS-unfolded states of rhodopsin. *Biochemistry*, 49(30):6329–40.
- [Dutta *et al.*, 2010b] DUTTA, A., TIRUPULA, K. C., ALEXIEV, U. et KLEIN-SEETHARAMAN, J. (2010b). Characterization of membrane protein non-native states. 1. Extent of unfolding and aggregation of rhodopsin in the presence of chemical denaturants. *Biochemistry*, 49(30):6317–28.
- [Eftink, 1994] EFTINK, M. (1994). The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophysical Journal*, 66(2):482–501.
- [Feenstra *et al.*, 1999] FEENSTRA, K. A., HESS, B. et BERENDSEN, H. J. C. (1999). Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulations of hydrogen-rich systems. *Journal of Computational Chemistry*, 20(8):786–798.
- [Forland *et al.*, 1994] FORLAND, G., SAMSETH, H., HOILAND, H. et MORTENSEN, K. (1994). The effect of medium chain length alcohols on the micellar properties of sodium dodecyl sulfate in sodium chloride solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 164:163–167.
- [Fujimoto *et al.*, 2013] FUJIMOTO, Z., SUZUKI, R., SHIOTSUKI, T., TSUCHIYA, W., TASE, A., MITSURU, M. et YAMAZAKI, T. (2013). Crystal structure of silkworm bombyx mori jhbp in complex with 2-methyl-2,4-pentanediol : Plasticity of jh-binding pocket and ligand-induced conformational change of the second cavity in jhbp. *PloS one*, 8:256–261.
- [Gao *et al.*, 2005] GAO, J., GE, W., HU, G. et LI, J. (2005). From homogeneous dispersion to micelles : A molecular dynamics simulation on the compromise of the hydrophilic and hydrophobic effects of sodium dodecyl sulfate in aqueous solution. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 21(11):5223–5229.
- [Gautam *et al.*, 2012] GAUTAM, S., DUBEY, P., RATHER, G. M. et GUPTA, M. N. (2012). Non-chromatographic strategies for protein refolding. *Recent Patents pn Biotechnology*, 6(1):57–68.
- [Goldberg *et al.*, 1991] GOLDBERG, M. E., RUDOLPH, R. et JAENICKE, R. (1991). A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry*, 30(11):2790–7.
- [Gonzalez-Montalban *et al.*, 2008] GONZALEZ-MONTALBAN, N., NATALELLO, A., GARCIA-FRUITOS, E., VILLAYERDE, A. et DOGLIA, S. (2008). In situ protein folding and activation in bacterial inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 100:797–802.
- [Grdadolnik, 2002] GRDADOLNIK, J. (2002). A FTIR investigation of protein conformation. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 21(1):23–34.

- [Gudiksen *et al.*, 2006] GUDIKNEN, K. L., GITLIN, I. et WHITESIDES, G. M. (2006). Differentiation of proteins based on characteristic patterns of association and denaturation in solutions of SDS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21):7968–72.
- [Guenther *et al.*, 2012] GUENTHER, I., ZOLKIEWSKI, M. et KEDZIERSKA-MIESZKOWSKA, S. (2012). Cooperation between two clpb isoforms enhances the recovery of the recombinant beta-galactosidase from inclusion bodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 5:596–600.
- [Guo *et al.*, 2014] GUO, D., HILLGER, J., IJZERMAN, A. et HEITMAN, L. (2014). Drug-target residence time : a case for g protein-coupled receptors. *Medicinal Research Reviews*, 34:856–892.
- [Hartl et Hayer-Hartl, 2002] HARTL, F. et HAYER-HARTL, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol : from nascent chain to folded protein. *Science*, 8:1852–1858.
- [Haslberger *et al.*, 2010] HASLBERGER, T., BUKAU, B. et MOGK, A. (2010). Towards a unifying mechanism for clpb/hsp104-mediated protein disaggregation and prion propagation. *Biochemical Cell Biology*, 88:63–75.
- [Hayashi et Ikeda, 1980] HAYASHI, S. et IKEDA, S. (1980). Micelle size and shape of sodium dodecyl sulfate in concentrated NaCl solutions. *Journal of Physical Chemistry*, 84:744–751.
- [Henkelman et Jónsson, 2000] HENKELMAN, G. et JÓNSSON, H. (2000). Improved tangent estimate in the nudged elastic band method for finding minimum energy paths and saddle points. *Journal of Chemical Physics*, 113(23):9978–9985.
- [Hess *et al.*, 2008] HESS, B., KUTZNER, C., van der SPOEL, D. et LINDAHL, E. (2008). GROMACS 4 : algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of theory and computation*, 4(3):435–447.
- [Heyda *et al.*, 2011] HEYDA, J., KO, M., BEDN, L., THOMPSON, G., KONVALINKA, J. et JUNGWIRTH, P. (2011). Urea and guanidinium induced denaturation of a Trp-cage miniprotein. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115:8910–8924.
- [Hoiland *et al.*, 1984] HOILAND, H., LJOSLAND, E. et BACKLUND, S. (1984). Solubilization of alcohols and alkanes in aqueous solution of sodium dodecyl sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science*, (101):467–471.
- [Holt et Killian, 2010] HOLT, A. et KILLIAN, J. A. (2010). Orientation and dynamics of transmembrane peptides : the power of simple models. *European biophysics journal : EBJ*, 39(4):609–21.
- [Holt *et al.*, 2009] HOLT, A., KOEHORST, R. B. M., RUTTERS-MEIJNEKE, T., GELB, M. H., RIJKERS, D. T. S., HEMMINGA, M. a. et KILLIAN, J. A. (2009). Tilt and rotation angles of a transmembrane model peptide as studied by fluorescence spectroscopy. *Biophysical journal*, 97(8):2258–66.
- [Hu *et al.*, 2011] HU, W., LIU, J., LUO, Q., HAN, Y., WU, K., LV, S., XIONG, S. et WANG, F. (2011). Elucidation of the binding sites of sodium dodecyl

- sulfate to β -lactoglobulin using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry combined with docking simulation. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM, 25(10):1429–36.
- [Huang *et al.*, 2011] HUANG, K., AMODEO, G., TONG, L. et A, M. (2011). The structure of human ubiquitin in 2-methyl-2,4-pentanediol : A new conformational switch. *Protein Science*, 20:630–639.
- [Huang *et al.*, 2009] HUANG, R., WU, L., MCELHENY, D., BOUR, P., ROY, A. et KEIDERLING, T. a. (2009). Cross-strand coupling and site-specific unfolding thermodynamics of a trpzip beta-hairpin peptide using ^{13}C isotopic labeling and IR spectroscopy. *The journal of physical chemistry. B*, 113(16):5661–74.
- [Hudaky *et al.*, 2008] HUDAKY, P., STRANER, P., FARKAS, V., VARADI, G., TOTH, G. et PERCZEL, A. (2008). Cooperation between a salt bridge and the hydrophobic core triggers fold stabilization in a Trp-Cage miniprotein. *Biochemistry*, 47:1007–1016.
- [Humphrey *et al.*, 1996] HUMPHREY, W., DALKE, A. et SCHULTEN, K. (1996). VMD : Visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1):33–38.
- [Huysmans *et al.*, 2007] HUYSMANS, G. H. M., RADFORD, S. E., BROCKWELL, D. J. et BALDWIN, S. a. (2007). The N-terminal helix is a post-assembly clamp in the bacterial outer membrane protein PagP. *Journal of molecular biology*, 373(3):529–40.
- [Iavarone et Parks, 2005] IAVARONE, A. T. et PARKS, J. H. (2005). Conformational change in unsolvated Trp-cage protein probed by fluorescence. *Journal of the American Chemical Society*, 127(24):8606–7.
- [Jalili et Akhavan, 2009] JALILI, S. et AKHAVAN, M. (2009). A coarse-grained molecular dynamics simulation of a sodium dodecyl sulfate micelle in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 352(1-3):99–102.
- [Jalili et Akhavan, 2011] JALILI, S. et AKHAVAN, M. (2011). Study of the Alzheimer’s A β 40 peptide in SDS micelles using molecular dynamics simulations. *Biophysical chemistry*, 153(2-3):179–86.
- [JG *et al.*, 1997] JG, T., A, A. et F, B. (1997). Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from e. coli. *Appl Biochem Biotechnol*, 66:197–238.
- [Jimonet et Jager, 2004] JIMONET, P. et JAGER, R. (2004). Strategies for designing gpcr focused libraries and screening sets. *Current opinion on drug discovery*, 7:325–333.
- [Johansson *et al.*, 2007] JOHANSSON, M. U., ALIOTH, S., HU, K., WALSER, R., KOEBNIK, R. et PERVUSHIN, K. (2007). A minimal transmembrane beta-barrel platform protein studied by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 46(5):1128–40.
- [Jonasson *et al.*, 2002] JONASSON, P., LILJEQVIST, S., NYGREN, P.-A. et STÅHL, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery

- of recombinant proteins in escherichia coli. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(Pt 2):91–105.
- [Junge *et al.*, 2008] JUNGE, F., SCHNEIDER, B., RECKEL, S., SCHWARZ, D., DÖTSCH, V. et BERNHARD, F. (2008). Large-scale production of functional membrane proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(11):1729–55.
- [Juraszek et Bolhuis, 2006] JURASZEK, J. et BOLHUIS, P. G. (2006). Sampling the multiple folding mechanisms of Trp-cage in explicit solvent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(43):15859–64.
- [Keller *et al.*, 2006] KELLER, S., HEERKLOTZ, H., JAHNKE, N. et BLUME, A. (2006). Thermodynamics of lipid membrane solubilization by sodium dodecyl sulfate. *Biophysical journal*, 90(12):4509–21.
- [Killian et Nyholm, 2006] KILLIAN, J. A. et NYHOLM, T. K. M. (2006). Peptides in lipid bilayers : the power of simple models. *Current opinion in structural biology*, 16(4):473–9.
- [Kleinschmidt et Tamm, 1996] KLEINSCHMIDT, J. et TAMM, L. K. (1996). Folding intermediates of a beta-barrel membrane protein. Kinetic evidence for a multi-step membrane insertion mechanism. *Biochemistry*, 35(40):12993–13000.
- [Kleinschmidt, 2003] KLEINSCHMIDT, J. H. (2003). Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of Escherichia coli. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(8):1547–58.
- [Kong et Yu, 2007] KONG, J. et YU, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica*, 39(8):549–559.
- [Krishnamani *et al.*, 2012] KRISHNAMANI, V., HEGDE, B. G., LANGEN, R. et LANYI, J. K. (2012). Secondary and tertiary structure of bacteriorhodopsin in the SDS denatured state. *Biochemistry*, 51(6):1051–60.
- [Krishnamani et Lanyi, 2012] KRISHNAMANI, V. et LANYI, J. K. (2012). Molecular dynamics simulation of the unfolding of individual bacteriorhodopsin helices in sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, 51(6):1061–9.
- [Kumar et Nussinov, 2002] KUMAR, S. et NUSSINOV, R. (2002). Close-range electrostatic interactions in proteins. *Chemistry and Biochemistry*, 3:604–617.
- [Laage et Langosch, 2001] LAAGE, R. et LANGOSCH, D. (2001). Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(2):99–104.
- [Lacapère *et al.*, 2007] LACAPÈRE, J.-J., PEBAY-PEYROULA, E., NEUMANN, J.-M. et ETCHEBEST, C. (2007). Determining membrane protein structures : still a challenge! *Trends in biochemical sciences*, 32(6):259–70.
- [le Maire *et al.*, 2000] le MAIRE, M., CHAMPEIL, P. et MOLLER, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et biophysica acta*, 1508(1-2):86–111.

- [Lee *et al.*, 2003] LEE, S., SOWA, M., WATANABE, Y., SIGLER, P., CHIU, W., YOSHIDA, M. et TSAI, F. (2003). The structure of clpb : a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell*, 115:229–240.
- [Mackerell, 1995] MACKERELL, A. D. (1995). Molecular dynamics simulation analysis of a sodium dodecyl sulfate micelle in aqueous solution : decreased fluidity of the micelle hydrocarbon interior. *Journal of Physical Chemistry*, 99:1846–1855.
- [Makhatadze et Privalov, 1995] MAKHATADZE, G. et PRIVALOV, P. (1995). Energetics of protein structure. *Advances in Protein Chemistry*, 47:307–425.
- [Mall et Hartl, 2014] MALL, M. et HARTL, D. (2014). Cftr : cystic fibrosis and beyond. *European respiratory journal*, ahead of print.
- [Manning et Colon, 2004] MANNING, M. et COLON, W. (2004). Structural basis of protein kinetic stability : Resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. *Biochemistry*, 43:11248–11254.
- [Marinez-Alonso *et al.*, 2008] MARINEZ-ALONSO, M., GONZALEZ-MONTALBAN, N., GARCIA-FRUITOS, E. et VILLAVERDE, A. (2008). The functional quality of soluble recombinant polypeptides produced in escherichia coli is defined by a wide conformational spectrum. *Applied and environmental microbiology*, 74:7431–7433.
- [Marquis et Ficht, 1993] MARQUIS, H. et FICHT, T. a. (1993). The omp2 gene locus of Brucella abortus encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infection and immunity*, 61(9):3785–90.
- [Marrink *et al.*, 2007] MARRINK, S., RISSELADA, H., YEFIMOV, S., TIELEMAN, D. et de VRIES, A. (2007). The MARTINI force field : coarse grained model for biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 111:7812–7824.
- [Martínez *et al.*, 2009] MARTÍNEZ, L., ANDRADE, R., BIRGIN, E. G. et MARTÍNEZ, J. M. (2009). Packmol : a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 30(13):2157–2164.
- [Mattice *et al.*, 1976] MATTICE, W. L., RISER, J. M. et CLARK, D. S. (1976). Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry*, 15(19):4264–72.
- [McMillan *et al.*, 2013] MCMILLAN, A. W., KIER, B. L., SHU, I., BYRNE, A., ANDERSEN, N. H. et PARSON, W. W. (2013). Fluorescence of tryptophan in designed hairpin and Trp-cage miniproteins : measurements of fluorescence yields and calculations by quantum mechanical molecular dynamics simulations. *The journal of physical chemistry. B*, 117(6):1790–809.
- [Michaux *et al.*, 2008a] MICHAUX, C., POMROY, N. C. et PRIVÉ, G. G. (2008a). Refolding SDS-denatured proteins by the addition of amphipathic cosolvents. *Journal of molecular biology*, 375(5):1477–88.

- [Michaux *et al.*, 2008b] MICHAUX, C., POUYEZ, J., WOUTERS, J. et PRIVÉ, G. G. (2008b). Protecting role of cosolvents in protein denaturation by SDS : a structural study. *BMC structural biology*, 8:29.
- [Miller *et al.*, 2009] MILLER, D., CHARALAMBOUS, K., ROTEM, D., SCHULDNER, S., CURNOW, P. et BOOTH, P. J. (2009). In vitro unfolding and refolding of the small multidrug transporter EmrE. *Journal of molecular biology*, 393(4):815–32.
- [Misra et Kishore, 2011] MISRA, P. P. et KISHORE, N. (2011). Biophysical analysis of partially folded state of α -lactalbumin in the presence of cationic and anionic surfactants. *Journal of colloid and interface science*, 354(1):234–47.
- [Mobasheri *et al.*, 1997] MOBASHERI, H., FICHT, T., MARQUIS, H., LEA, E. et LAKEY, J. (1997). Brucella Omp2a and Omp2b porins : single channel measurements and topology prediction. *FEMS Microbiology letters*, 155:23–30.
- [Moriyama *et al.*, 2012] MORIYAMA, Y., KONDO, N. et TAKEDA, K. (2012). Secondary structural changes of homologous proteins, lysozyme and α -lactalbumin, in thermal denaturation up to 130 °C and sodium dodecyl sulfate (SDS) effects on these changes : Comparison of thermal stabilities of SDS-induced helical structures in these proteins. *Langmuir*, 28:16268–16273.
- [Muñoz *et al.*, 2006] MUÑOZ, V., GHIRLANDO, R., BLANCO, F. J., JAS, G. S., HOFRICHTER, J. et EATON, W. a. (2006). Folding and aggregation kinetics of a beta-hairpin. *Biochemistry*, 45(23):7023–35.
- [Naidu et Prabhu, 2011] NAIDU, K. T. et PRABHU, N. P. (2011). Protein-surfactant interaction : sodium dodecyl sulfate-induced unfolding of ribonuclease A. *The journal of physical chemistry. B*, 115(49):14760–7.
- [Negin et Carbeck, 2002] NEGIN, R. S. et CARBECK, J. D. (2002). Measurement of electrostatic interactions in protein folding with the use of protein charge ladders. *Journal of the American Chemical Society*, 124(12):2911–6.
- [Neidigh *et al.*, 2002] NEIDIGH, J. W., FESINMEYER, R. M. et ANDERSEN, N. H. (2002). Designing a 20-residue protein. *Nature structural biology*, 9(6):425–30.
- [Nielsen *et al.*, 2005] NIELSEN, A. D., ARLETH, L. et WESTH, P. (2005). Analysis of protein-surfactant interactions : A titration calorimetric and fluorescence spectroscopic investigation of interactions between Humicola insolens cutinase and an anionic surfactant. *Biochimica et biophysica acta*, 1752(2):124–32.
- [Nielsen *et al.*, 2007] NIELSEN, M. M., ANDERSEN, K. K., WESTH, P. et OTZEN, D. E. (2007). Unfolding of beta-sheet proteins in SDS. *Biophysical journal*, 92(10):3674–85.
- [Oellerich *et al.*, 2003] OELLERICH, S., WACKERBARTH, H. et HILDEBRANDT, P. (2003). Conformational equilibria and dynamics of cytochrome c induced by binding of sodium dodecyl sulfate monomers and micelles. *European Biophysics Journal*, 32(7):599–613.
- [Onuchic et Wolynes, 2004] ONUCHIC, J. et WOLYNES, P. (2004). Theory of protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, 14:70–75.

- [Oostenbrink *et al.*, 2004] OOSTENBRINK, C., VILLA, A., MARK, A. E. et VAN GUNSTEREN, W. F. (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation : the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of computational chemistry*, 25(13):1656–76.
- [Otzen, 2002] OTZEN, D. E. (2002). Protein unfolding in detergents : effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature. *Biophysical journal*, 83(4):2219–30.
- [Otzen *et al.*, 2008] OTZEN, D. E., NESGAARD, L. W., ANDERSEN, K. K., HANSEN, J. H. e., CHRISTIANSEN, G., DOE, H. et SEHGAL, P. (2008). Aggregation of S6 in a quasi-native state by sub-micellar SDS. *Biochimica et biophysica acta*, 1784(2):400–14.
- [Pace *et al.*, 1996] PACE, C., SHIRLEY, B., MCNUTT, M. et GAJIWALA, K. (1996). Forces contributing to the conformational stability of proteins. *The journal of the federation of american societies for experimental biology*, 10:75–83.
- [Paquet *et al.*, 2000] PAQUET, J., VINALS, C., WOUTERS, J., LETESSON, J. et DEPIEREUX, E. (2000). Topology prediction of Brucella abortus Omp2b and Omp2a porins after critical assessment of transmembrane beta strands prediction by several secondary structure prediction methods. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, (17):747–757.
- [Paquet *et al.*, 2001] PAQUET, J.-Y., DIAZ, M. A., GENEVROIS, S., GRAYON, M., VERGER, J.-M., BOLLE, X. D. E., LAKEY, J. H., LETESSON, J.-j. et CLOECKAERT, A. (2001). Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of Brucella spp. *Journal of bacteriology*, 183(16):4839–4847.
- [Paschek *et al.*, 2008] PASCHEK, D., HEMPEL, S. et GARCÍA, A. E. (2008). Computing the stability diagram of the Trp-cage miniprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46):17754–9.
- [Patil *et al.*, 2009] PATIL, S. M., XU, S., SHEFTIC, S. R. et ALEXANDRESCU, A. T. (2009). Dynamic alpha-helix structure of micelle-bound human amylin. *The Journal of biological chemistry*, 284(18):11982–91.
- [Ponder et Case, 2003] PONDER, J. W. et CASE, D. A. (2003). Force fields for protein simulations. *Advances in protein chemistry*, 66:27–83.
- [Qiu *et al.*, 2002] QIU, L., PABIT, S. A., ROITBERG, A. E. et HAGEN, S. J. (2002). Smaller and faster : the 20-residue Trp-cage protein folds in 4 micros. *Journal of the American Chemical Society*, 124(44):12952–3.
- [Quina *et al.*, 1995] QUINA, F. H., PRETO, R. et BALES, B. L. (1995). Growth of sodium dodecyl sulfate micelles with detergent concentration. *Journal of Physical Chemistry*, 99:17028–17031.
- [Rankenberg *et al.*, 2012] RANKENBERG, J. M., VOSTRIKOV, V. V., DUVALL, C. D., GREATHOUSE, D. V., KOEPPE, R. E., GRANT, C. V. et OPELLA, S. J. (2012). Proline kink angle distributions for GWALP23 in lipid bilayers of different thicknesses. *Biochemistry*, 51(17):3554–64.

- [Rath *et al.*, 2009a] RATH, A., GLIBOWICKA, M., NADEAU, V. G., CHEN, G. et DEBER, C. M. (2009a). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6):1760–1765.
- [Rath *et al.*, 2009b] RATH, A., TULUMELLO, D. V. et DEBER, C. M. (2009b). Peptide models of membrane protein folding. *Biochemistry*, 48:3036–3045.
- [Reid *et al.*, 1988] REID, J., FUNG, H., GEHRINGS, K., KLEBBAG, P. E. et NIKAI, H. (1988). Targeting of porin to the outer membrane of *Escherichia coli* : Rate of trimer assembly and identification of a dimer intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(5):7753–7759.
- [Reshetnyak *et al.*, 2001] RESHETNYAK, Y. K., KOSHEVNIK, Y. et BURSTEIN, E. a. (2001). Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophysical journal*, 81(3):1735–58.
- [Rinas *et al.*, 2007] RINAS, U., HOFFMAN, F., BETIKU, E., ESTAPE, D. et MARTEN, S. (2007). Inclusion body formation anatomy and functioning of the chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 127:244–257.
- [Roussel *et al.*, 2012] ROUSSEL, G., MATAGNE, A., DE BOLLE, X., PERPÈTE, E. A. et MICHAUX, C. (2012). Purification, refolding and characterization of the trimeric Omp2a outer membrane porin from *Brucella melitensis*. *Protein expression and purification*, 83(2):198–204.
- [Roussel *et al.*, 2013a] ROUSSEL, G., PERPÈTE, E. A., MATAGNE, A., TINTI, E. et MICHAUX, C. (2013a). Towards a universal method for protein refolding : The trimeric beta barrel membrane Omp2a as a test case. *Biotechnology and bioengineering*, 110(2):417–23.
- [Roussel *et al.*, 2014] ROUSSEL, G., ROUSE, S. L., SANSOM, M. S. P., MICHAUX, C. et PERPÈTE, E. A. (2014). The role of 2-methyl-2, 4-pentanediol in sodium dodecyl sulfate micelle dissociation unveiled by dynamic light scattering and molecular dynamics simulations. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 114:357–62.
- [Roussel *et al.*, 2013b] ROUSSEL, G., TINTI, E., PERPÈTE, E. et MICHAUX, C. (2013b). Refolding of SDS-Denatured Proteins Using Amphipathic Cosolvents and Osmolytes. *Current protocols in protein science*, Chapter 28(28.5):1–9.
- [Roy *et al.*, 2009] ROY, A., BOUR, P. et KEIDERLING, T. A. (2009). TD-DFT modeling of the circular dichroism for a tryptophan zipper peptide with coupled aromatic residues. *Chirality*, 21:163–171.
- [Ruckenstein et Shulgin, 2006] RUCKENSTEIN, E. et SHULGIN, I. L. (2006). Effect of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions. *Advances in colloid and interface science*, 123-126:97–103.
- [Safarpour *et al.*, 1999] SAFARPOUR, M. A., RAFATI, A. A., GHARIBI, H. et SAMETI, M. R. (1999). Influence of short-chain alcohols on the micellization

- parameters of sodium dodecyl sulfate. *Journal of chinese chemical society*, 46(6):983 – 992.
- [Sammalkorpi *et al.*, 2007] SAMMALKORPI, M., KARTTUNEN, M. et HAATAJA, M. (2007). Structural properties of ionic detergent aggregates : a large-scale molecular dynamics study of sodium dodecyl sulfate. *The journal of physical chemistry. B*, 111(40):11722–33.
- [Sangwai et Sureshkumar, 2011] SANGWAI, A. et SURESHKUMAR, R. (2011). Coarse-grained molecular dynamics simulations of the sphere to rod transition in surfactant micelles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 27(11):6628–38.
- [Sarma *et al.*, 2011] SARMA, N., BORAH, J. M., MAHIUDDIN, S., GAZI, H. A. R., GUCHHAIT, B. et BISWAS, R. (2011). Influence of chain length of alcohols on Stokes’ shift dynamics in catanionic vesicles. *The journal of physical chemistry. B*, 115(29):9040–9.
- [Schneider *et al.*, 2008] SCHNEIDER, G. F., SHAW, B. F., LEE, A., CARILLHO, E. et GEORGE, M. (2008). Pathway for Unfolding of Ubiquitin in Sodium Dodecyl Sulfate, Studied by Capillary Electrophoresis. *Journal of American Chemical Society*, 130(51):17384–17393.
- [Schrodel et de Marco, 2005] SCHRODEL, A. et de MARCO, A. (2005). Characterization of the aggregates formed during recombinant protein expression in bacteria. *BMC Biochemistry*, 31:6–10.
- [Seshasayee, 2005] SESHASAYEE, A. S. N. (2005). High-temperature unfolding of a trp-cage mini-protein : a molecular dynamics simulation study. *Theoretical biology & medical modelling*, 2:7.
- [Settanni et Fersht, 2008] SETTANNI, G. et FERSHT, A. R. (2008). High temperature unfolding simulations of the TRPZ1 peptide. *Biophysical journal*, 94(11):4444–53.
- [Shaw *et al.*, 2011] SHAW, B. F., SCHNEIDER, G. F., ARTHANARI, H., NAROVLYANSKY, M., MOUSTAKAS, D., DURAZO, A., WAGNER, G. et WHITESIDES, G. M. (2011). Complexes of native ubiquitin and dodecyl sulfate illustrate the nature of hydrophobic and electrostatic interactions in the binding of proteins and surfactants. *Journal of the American Chemical Society*, 133(44):17681–95.
- [Shaw *et al.*, 2012] SHAW, B. F., SCHNEIDER, G. F. et WHITESIDES, G. M. (2012). Effect of surfactant hydrophobicity on the pathway for unfolding of ubiquitin. *Journal of the American Chemical Society*, 134(45):18739–45.
- [Singh et Panda, 2005] SINGH, S. et PANDA, A. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99:303–310.
- [Siritapetawee *et al.*, 2004] SIRITAPETAWE, J., PRINZ, H., KRITTANAI, C. et SUGINTA, W. (2004). Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *The Biochemical journal*, 384(Pt 3):609–17.
- [Stephany *et al.*, 1994] STEPHANY, S. M., KOLE, T. M. et FISCH, M. R. (1994). Light scattering study of the effects of 1-pentanol on solutions of sodium

- dodecyl sulfate in NaCl-H₂O solutions. *Journal of Physical Chemistry*, 98: 11126–11128.
- [Stilbs, 1982] STILBS, P. (1982). Micellar breakdown by short-chain alcohols. A multicomponent FT-PGSE-NMR self-diffusion study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 89(2):547–554.
- [Streicher et Makhatadze, 2007] STREICHER, W. W. et MAKHATADZE, G. I. (2007). Unfolding thermodynamics of Trp-cage, a 20 residue miniprotein, studied by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry*, 46(10):2876–80.
- [Surrey et Jähnig, 1995] SURREY, T. et JÄHNIG, F. (1995). Kinetics of folding and membrane insertion of a beta-barrel membrane protein. *The Journal of biological chemistry*, 270(47):28199–203.
- [Surrey et al., 1996] SURREY, T., SCHMID, A. et JÄHNIG, F. (1996). Folding and membrane insertion of the trimeric beta-barrel protein OmpF. *Biochemistry*, 35(7):2283–8.
- [Takekiyo et al., 2009] TAKEKIYO, T., WU, L., YOSHIMURA, Y., SHIMIZU, A. et KEIDERLING, T. (2009). Relationship between hydrophobic interactions and secondary structure stability for Trpzip beta-hairpin peptides. *Biochemistry*, 48:1543–1552.
- [Tamm et al., 2004] TAMM, L. K., HONG, H. et LIANG, B. (2004). Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1666(1-2):250–63.
- [Tanaka et al., 2005] TANAKA, K., PESCIPELLI, G., NAKANISHI, K. et BE-ROVA, N. (2005). Fluorescence detected exciton coupled circular dichroism : development of new fluorescent reporter groups for structural studies. *Monatshefte für Chemie*, 136:367–395.
- [Tanaka et al., 2011] TANAKA, Y., HIRANO, N., KANEKO, J., KAMIO, Y., YAO, M. et TANAKA, I. (2011). 2-methyl-2,4-pentanediol induces spontaneous assembly of staphylococcal α -hemolysin into heptameric pore structure. *Protein Science*, 20(2):448–456.
- [Tian et al., 2012] TIAN, J., SETHI, A., ANUNCIADO, D., VU, D. M. et GNANAKARAN, S. (2012). Characterization of a disordered protein during micellization : Interactions of α -synuclein with sodium dodecyl sulfate. *The journal of physical chemistry. B*, 116(15):4417–24.
- [Tsumoto et al., 2004] TSUMOTO, K., UMEZSU, M., KUMAGAI, I., EJIMA, D., PHILO, J. et ARAKAWA, T. (2004). Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnology Program*, 20:1301–1308.
- [Tulumello et Deber, 2009] TULUMELLO, D. V. et DEBER, C. M. (2009). SDS micelles as a membrane-mimetic environment for transmembrane segments. *Biochemistry*, 48(51):12096–103.
- [Tulumello et Deber, 2011] TULUMELLO, D. V. et DEBER, C. M. (2011). Positions of polar amino acids alter interactions between transmembrane segments and detergents. *Biochemistry*, 50(19):3928–35.

- [Tulumello et Deber, 2012] TULUMELLO, D. V. et DEBER, C. M. (2012). Efficiency of detergents at maintaining membrane protein structures in their biologically relevant forms. *Biochimica et biophysica acta*, pages 1–8.
- [Turro et Lei, 1995] TURRO, N. J. et LEI, X.-g. (1995). Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions : the BSNSDS system. *Langmuir*, 11(7):2525–2533.
- [Vallejo et Rinas, 2004] VALLEJO, L. F. et RINAS, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3(1):11–23.
- [Valstar et al., 1999] VALSTAR, A., BROWN, W. et ALMGREN, M. (1999). The lysozyme-sodium dodecyl sulfate system studied by dynamic and static light scattering. *Langmuir*, 15(7):2366–2374.
- [Veerappan et al., 2011] VEERAPPAN, A., CYMER, F., KLEIN, N. et SCHNEIDER, D. (2011). The tetrameric α -helical membrane protein GlpF unfolds via a dimeric folding intermediate. *Biochemistry*, 50(47):10223–30.
- [Venkatachalam, 1968] VENKATACHALAM, C. M. (1968). Stereochemical criteria for polypeptides and proteins : Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers*, 6(10):1425–36.
- [Visudtiphole et al., 2005] VISUDTIPHOLE, V., THOMAS, M. B., CHALTON, D. a. et LAKEY, J. H. (2005). Refolding of Escherichia coli outer membrane protein F in detergent creates LPS-free trimers and asymmetric dimers. *The Biochemical journal*, 392(Pt 2):375–81.
- [Wafer et al., 2010] WAFER, L. N. R., STREICHER, W. W. et MAKHATADZE, G. I. (2010). Thermodynamics of the Trp-cage miniprotein unfolding in urea. *Proteins*, 78(6):1376–81.
- [Wang et al., 1996] WANG, G., TRELEAVEN, W. D. et CUSHLEY, R. J. (1996). Conformation of human serum apolipoprotein A-I (166-185) in the presence of sodium dodecyl sulfate or dodecylphosphocholine by H-NMR and CD. Evidence for specific peptide-SDS interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1301:174–184.
- [Wang et al., 2010] WANG, Q., HONG, G., JOHNSON, G. R., PACTER, R. et CHEUNG, M. S. (2010). Biophysical properties of membrane-active peptides based on micelle modeling : a case study of cell-penetrating and antimicrobial peptides. *The journal of physical chemistry. B*, 114(43):13726–35.
- [Watanabe et Inoko, 2009] WATANABE, Y. et INOKO, Y. (2009). Reassembly of an integral oligomeric membrane protein OmpF porin in n-octyl beta-D-glucopyranoside-lipids mixtures. *The protein journal*, 28(2):66–73.
- [Watarai et al., 2000] WATARAI, H., INAGAKI, Y., KUBOTA, N., FUJU, K., NAGAFUNE, J., YAMAGUCHI, Y. et KADOYA, T. (2000). Proteomic approach to the identification of cell membrane proteins. *Electrophoresis*, 21(2):460–464.
- [Wilkins et al., 1999] WILKINS, M. R., GASTEIGER, E., BAIROCH, a., SANCHEZ, J. C., WILLIAMS, K. L., APPEL, R. D. et HOCHSTRASSER, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 112:531–52.

- [Wilks et Slonczewski, 2007] WILKS, J. C. et SLONCZEWSKI, J. L. (2007). pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* : rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *Journal of bacteriology*, 189(15):5601–7.
- [Wu et al., 2009] WU, L., MCELHENY, D., HUANG, R. et KEIDERLING, T. A. (2009). Role of tryptophan-tryptophan interactions in Trpzip beta-hairpin formation, structure, and stability. *Biochemistry*, 48(43):10362–71.
- [Wu et al., 2010] WU, L., MCELHENY, D., TAKEKIYO, T. et KEIDERLING, T. A. (2010). Geometry and efficacy of cross-strand Trp/Trp, Trp/Tyr, and Tyr/Tyr aromatic interaction in a beta-hairpin peptide. *Biochemistry*, 49(22):4705–14.
- [Yan et al., 2010] YAN, H., YUAN, S.-L., XU, G.-Y. et LIU, C.-B. (2010). Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions on surfactant solutions investigated by molecular dynamics simulation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 26(13):10448–59.
- [Yang et al., 2004] YANG, W. Y., PITERA, J. W., SWOPE, W. C. et GRUEBELE, M. (2004). Heterogeneous Folding of the trpzip Hairpin : Full Atom Simulation and Experiment. *Journal of Molecular Biology*, 336(1):241–251.
- [Zana, 1995] ZANA, R. (1995). Aqueous surfactant-alcohol systems : a review. *Science*, 57:1–64.
- [Zhang et al., 2009] ZHANG, J., LI, W., WANG, J., QIN, M., WU, L., YAN, Z., XU, W., ZUO, G. et WANG, W. (2009). Protein folding simulations : from coarse-grained model to all-atom model. *IUBMB life*, 61(6):627–43.
- [Zhou, 2003] ZHOU, R. (2003). Trp-cage : folding free energy landscape in explicit water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23):13280–5.
- [Zuev et al., 2004] ZUEV, Y., FAIZULLIN, D., IDIYATULLIN, B., MUKHITOVA, F., CHOBERT, J.-M., FEDOTOV, V. et HAERTLE, T. (2004). Aggregation of sodium dodecyl sulfate in micellar solution of b-casein analyzed by ^1H -NMR self-diffusion, relaxation and Fourier transform IR spectroscopy. *Colloid & Polymer Science*, 282(3):264–269.

CHAPITRE 7

Annexes - Publications
